



**Exploration fonctionnelle de la réponse au stress chez
des micro-organismes d'intérêt technologique :
dynamique de la réponse membranaire suite au stress
éthanolique chez *Saccharomyces cerevisiae***

Quoc-Bao Vo-Van

► **To cite this version:**

Quoc-Bao Vo-Van. Exploration fonctionnelle de la réponse au stress chez des micro-organismes d'intérêt technologique : dynamique de la réponse membranaire suite au stress éthanolique chez *Saccharomyces cerevisiae*. Alimentation et Nutrition. Université de Bourgogne, 2015. Français. NNT : 2015DIJOS057 . tel-01303137

HAL Id: tel-01303137

<https://theses.hal.science/tel-01303137>

Submitted on 16 Apr 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



UNIVERSITE DE BOURGOGNE
AGROSUP DIJON
Institut Universitaire de la Vigne et du Vin
UMR PAM, Equipes VAlMiS &PMB

THESE de DOCTORAT

Discipline : Sciences de l'Alimentation

par
Quoc-Bao VO-VAN

présentée et soutenue le 14 avril 2015

**Exploration fonctionnelle de la réponse au stress chez des
micro-organismes d'intérêt technologique : Dynamique de la
réponse membranaire suite au stress éthanolique chez
*Saccharomyces cerevisiae***

Devant le Jury composé de :

Mme FONSECA Fernanda	INRA/AgroParis Tech	Rapporteur
Mme TESNIERE Catherine	INRA Montpellier	Rapporteur
Mr DELAUNAY Stéphane	Université de Lorraine ENSAIA	Examineur
Mr FERREIRA Thierry	Université de Poitiers	Examineur
Mr GOUGEON Régis	Université de Bourgogne	Examineur
Mr MARECHAL Pierre-André	AgroSup Dijon	Examineur
Mr BENEY Laurent	AgroSup Dijon	Co-encadrant thèse
Mme TOURDOT-MARECHAL Raphaëlle	Université de Bourgogne	Directrice thèse



à mes parents Hoàng & Tuy,

à mon épouse Chí Hải et mes deux filles : Hải Châu et Cát Tường,

REMERCIEMENTS

C'est un plaisir de rédiger cette page de remerciements. Beaucoup de personnes ont participé à l'élaboration de ce travail et je tiens à remercier ici l'ensemble des personnes avec qui j'ai pu travailler au cours de ma thèse, sur le terrain et au laboratoire. J'aimerais avant tout remercier Monsieur Pierre-André Maréchal et mes deux directeurs de thèse Madame Raphaëlle Tourdot-Maréchal et Monsieur Laurent Beney, ainsi que les organismes financeurs : le Ministère de l'Education et de la Formation du Vietnam, Campus France, le Crous Dijon et AgroSup Dijon grâce auxquels j'ai pu arriver et étudier en France.

J'adresse mes remerciements à Mesdames Fernanda Fonseca et Catherine Tesnière qui m'ont fait l'honneur d'examiner mon travail en tant que rapporteurs. Je remercie également le Messieurs Stéphane Delaunay et Régis Gougeon d'avoir accepté d'être membres du jury.

Je tiens à exprimer ma profonde et respectueuse gratitude à Raphaëlle Tourdot-Maréchal, ma directrice de thèse, pour ses nombreux conseils, sa confiance, sa disponibilité, sa patience, son enthousiasme, ses encouragements et son soutien durant ces années.

J'exprime ma reconnaissance à Laurent Beney, mon co-directeur de thèse pour ses nombreux conseils, sa patience et son soutien durant ces années.

Un grand merci à Pierre-André Maréchal et Thierry Ferreira pour leur participation aux comités de thèse et leurs orientations et propositions au cours de mon travail. Merci également à eux pour bien avoir voulu examiner mon travail de thèse.

Je remercie également Sébastien Dupont, en particulier, pour tous ses nombreux conseils en techniques scientifiques ainsi que pour la relecture de mon manuscrit.

Un grand merci à Hervé Alexandre de m'avoir accueilli au sein de l'équipe VALMiS pendant ces années.

Je désire remercier tous ceux qui ont travaillé à mes côtés et qui ont contribué à créer une bonne ambiance au laboratoire, en particulier Mohand, Cédric G, Youzhong, Franck, Christian, Magali, Maud, Chloé, Cédric L, Lemia, Alex, Florian. Merci également à Cyril, Sylvie, Pascale, Koi de l'équipe PMB pour leur gentillesse. Un grand merci à Vanessa David qui a toujours été là, avec le sourire, pour son amitié, pour les questions pratiques et logistiques.

Un merci spécial à tous mes amis vietnamiens, pour leur soutien, leur amitié et pour avoir partagé de bon moments avec moi durant mon séjour sur Dijon.

Je n'oublie pas d'exprimer ma reconnaissance à Agnès Roy, ma propriétaire, pour son soutien, sa gentillesse et son amitié. C'est grâce à elle que mes amis vietnamiens, mon épouse et moi avons visité les châteaux et quelques villes de France, et appris le français. Et également un grand merci à sa sœur Laurence Le Cornec.

Enfin, je remercie ma famille pour son soutien et ses encouragements, en particulier mes parents, mon épouse et mes deux filles qui m'ont permis de réaliser mes projets.

Résumé

L'étude de la réponse membranaire suite au stress éthanolique chez *Saccharomyces cerevisiae* vise à comprendre les mécanismes impliqués dans la survie des eucaryotes aux concentrations en éthanol élevées. La membrane cellulaire, par sa position entre l'environnement intra et extracellulaire, est la première cible des perturbations éthanoliques. Les expérimentations effectuées dans cette étude visent à caractériser le maintien de l'intégrité fonctionnelle en relation avec la composition en stérols membranaires chez la levure *S. cerevisiae* soumise à différents types de perturbations éthanoliques (augmentation de la concentrations en éthanol dans le milieu de croissance, chocs éthanoliques d'amplitude croissante et suivi au cours du temps ; choc à 20% pendant 15 minutes puis suivi au cours du temps après retour dans un milieu sans éthanol (« pulse » 20% d'éthanol)). Les résultats obtenus démontrent l'importance de l'ergostérol dans le maintien de l'intégrité membranaire et supportent également l'hypothèse du rôle « vecteur » de l'éthanol vis à vis d'une oxydation, dont l'efficacité serait dépendante de la nature des stérols présents au niveau membranaire. Les premiers résultats analysant la cinétique de transcription de gènes impliqués dans la réponse au stress oxydatif suggèrent une formation plus importante de formes réactives de l'oxygène (ROS), induite par le choc éthanol chez un mutant *Δerg6*, affecté dans la voie de biosynthèse de l'ergostérol.

Mots-clés : stress éthanol, ergostérol, perméabilité et fluidité membranaire, stress oxydatif, *Saccharomyces cerevisiae*.

Abstract

The study of membrane response induced by ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae* aims to understand mechanisms involved in the survival of eukaryotic cells submitted to high ethanol concentrations. The cell membrane by its position between the intra- and extracellular environment is the first target of ethanolic perturbations. Experiments performed in this study aimed to characterize the maintain of the functional integrity of the membrane in relation to the sterol composition in the yeast *S. cerevisiae* submitted to different types of ethanolic disturbances: increasing concentrations of ethanol in the growth medium; ethanolic shocks of increasing magnitude; shock 20% ethanol for 15 minutes and then return in a medium without ethanol ("pulse" 20% ethanol)). Our results demonstrate the importance of ergosterol in maintaining membrane integrity and also support the hypothesis of the vector role of ethanol in cell oxidation, whose effectiveness is dependent on the nature of sterols at the membrane level. In addition, our results analyzing the kinetics of transcription of genes involved in oxidative stress response suggest an increased formation of reactive oxygen species (ROS) induced by ethanol in the *Δerg6* mutant, affected in the biosynthetic pathway of ergosterol.

Key words: ethanol stress, ergosterol, membrane permeability and fluidity, oxidative stress, *Saccharomyces cerevisiae*.

SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES.....	5
LISTE DES TABLEAUX	9
LISTE DES ABREVIATIONS	10
INTRODUCTION	12
PARTIE 1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	14
CHAPITRE 1 : GENERALITE : LA MEMBRANE PLASMIQUE LEVURIENNE.....	14
1.1. Structure et fonction de la membrane cellulaire et de la paroi	16
1.1.1. Lipides membranaires	17
1.1.1.1. Les phospholipides.....	18
1.1.1.2. Les sphingolipides.....	20
1.1.1.3. Les stérols	22
1.1.2. Les protéines membranaires	27
1.1.3. La paroi de la levure	30
1.2. Effet de la structure des lipides sur les propriétés membranaires.....	31
1.2.1. Asymétrie de la bicouche lipidique	31
1.2.2. Fluidité membranaire.....	32
1.2.2.1. Propriétés de fluidité membranaire	33
1.2.2.2. Mouvement des phospholipides	34
1.2.3. Perméabilité	35
CHAPITRE 2 : EFFET DE L'ETHANOL SUR LA MEMBRANE PLASMIQUE DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE	38
2.1. Effet de l'éthanol sur la fonction de la membrane	38
2.1.1. Effet de l'éthanol sur la composition de la membrane.....	38
2.1.2. Effets de l'éthanol sur les transporteurs membranaires	39
2.2. Effet de l'éthanol sur la fluidité de la membrane	39
2.3. Relations entre le stress éthanol et le stress oxydatif.....	40

CHAPITRE 3 : REPONSE AU STRESS ETHANOL CHEZ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*..... 43

3.1. Teneur en ergostérol dans la membrane plasmique et tolérance à l'éthanol chez *S. cerevisiae*..... 43

3.1.1. L'ergostérol atténue l'inter-digitation des groupes d'acides gras membranaires en conditions de stress éthanol 43

3.1.2. L'ergostérol diminue la perméabilité de la membrane en conditions de stress éthanol 44

3.1.3. Impact de l'expression des gènes de biosynthèse de l'ergostérol sur les niveaux de tolérance à l'éthanol 44

3.2. Rôle de la vacuole dans la réponse au stress éthanol 45

3.3. Expression globale des gènes en réponse au stress éthanol..... 46

CHAPITRE 4 : METHODES DE MESURE DE L'ETAT PHYSIQUE DES LIPIDES MEMBRANAIRES EN CONDITION DE STRESS ETHANOL..... 49

4.1. Techniques d'étude de la structure des membranes 49

4.2. Sondes de fluorescence..... 51

4.2.1. Le principe..... 52

4.2.2. Les avantages..... 52

4.2.3. L'inconvénient..... 53

4.2.4. Principales sondes membranaires utilisées en spectroscopie de fluorescence . 54

CONCLUSION DE L'ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE ET PRESENTATION DES OBJECTIFS DE LA THESE 56

PARTIE II : MATERIELS ET METHODES..... 58

CHAPITRE 1 : SOUCHES DE LEVURES ET CONDITIONS DE CULTURES 58

1.1. Souches de levures..... 58

1.2. Milieu Malt Wickerham modifié gélosé..... 59

1.3. Milieu Malt Wickerham modifié (MWm) enrichi en éthanol 60

1.4. Moût synthétique 60

1.5. Conditions de culture..... 61

1.5.1. Conduite des fermentations alcooliques (adaptation en conditions fermentaires)	61
1.5.2. Croissance en présence d'éthanol (adaptation en conditions non fermentaires)	61
1.5.3. Mode de culture et réalisation des chocs éthanol	61
1.5.3.1. Cultures statiques.....	61
1.5.3.2. Cultures agitées.....	63
CHAPITRE 2 : METHODES ANALYTIQUES	63
2.1. Numération cellulaire et mesure de viabilité par hématimétrie.....	63
2.2. Evaluation de l'intégrité membranaire	64
2.3. Dosage des sucres et de l'éthanol par méthode enzymatique.....	67
2.4. Mesure de la variation de la fluidité membranaire par anisotropie de fluorescence du TMA-DPH.....	67
2.5. Etude transcriptomique par PCR quantitative en temps réel	68
2.5.1. Extraction et purification de l'ARN	68
2.5.2. Traitement à la DNase	69
2.5.3. Contrôle du traitement à la DNase	69
2.5.4. Synthèse d'ADNc	69
2.5.5. RT-PCR quantitative	70
2.6. Analyse statistique.....	72
PARTIE III : RESULTATS ET DISCUSSION	73
CHAPITRE I : ETUDE DE L'EFFET DE L'ETHANOL SUR LA TOLERANCE ET LA CROISSANCE DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE WILD TYPE ET DE SES MUTANTS AFFECTES DANS LA VOIE DE SYNTHESE DE L'ERGOSTEROL (ΔERG).....	74
1.1 Croissance des souches en conditions fermentaires	74
1.2 Effet de la concentration en éthanol sur la croissance des souches.....	76
1.3. Effet d'un choc éthanol sur la viabilité de la souche WT et la souche mutante Δ erg6	79
1.3.1. Comparaison de l'effet d'un choc éthanol (10 et 14%) sur cellules cultivées en conditions statiques ou sous agitation	80

1.3.1.1. Cultures statiques.....	80
1.3.1.2. Cultures sous agitation	82
1.3.1.3. Discussion.....	84
1.3.2. Effet de chocs éthanol à 16, 18, 20, 30 et 40% v/v sur la viabilité et sur l'intégrité membranaire	85
1.4. Discussion.....	88
CHAPITRE 2 : EFFET D'UN CHOC ETHANOL 20% V/V – COMPARAISON SOUCHE WILD TYPE ET SOUCHE <i>ΔERG6</i>	91
2.1. Effet d'un choc éthanol à 20% sur la viabilité et sur l'intégrité membranaire.....	91
2.1.1. Effet direct d'un choc éthanol à 20% pendant 60 minutes	91
2.1.1.1. Cinétique de perméabilisation membranaire lors d'un choc éthanol à 20% pendant 60 minutes	92
2.1.1.2. Mesure de la mortalité induite par le choc éthanol à 20% après 60 minutes	93
2.1.1.3. Effet direct du choc éthanol sur la fluidité membranaire	94
2.1.2. Effet indirect du choc éthanol appliqué sous forme de « pulse » (20% v/v d'éthanol – 15 minutes).....	98
2.1.2.1. Effet d'un choc éthanol à 20% pendant 15 minutes (« pulse ») sur l'intégrité membranaire – suivi pendant 3 heures	98
2.1.2.2. Effet d'un choc éthanol à 20% pendant 15 minutes (« pulse ») sur la viabilité membranaire – suivi pendant 3 heures.....	100
2.1.2.3. Effet indirect du stress éthanol appliqué sous forme de « Pulse » (20% v/v d'éthanol – 15 minutes) sur la fluidité membranaire.....	101
2.1.2. Discussion.....	103
2.2. Expression de gènes-cibles chez les souches WT et <i>Δerg6</i> au cours du choc éthanol appliqué sous forme de « pulse » 20% v/v- 15 minutes	104
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	109
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	113

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Représentation schématique de la paroi et la membrane plasmique de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	14
Figure 2 : Représentation schématique de la mitochondrie chez la levure. A) Organisation structurale B) Vue en microscopie électronique	15
Figure 3 : Représentation schématique d'une membrane biologique	16
Figure 4 : Représentation schématique d'une coupe transversale de liposome	19
Figure 5 : Structure et composition d'un phospholipide	19
Figure 6 : Représentation schématique des sphingolipides	21
Figure 7 : (A) Formule chimique des différents stérols. (B) Insertion des stérols dans une bicouche lipidique.	22
Figure 8 : Voie de synthèse des stérols dans les plantes, les animaux et les champignons	23
Figure 9 : Structures des bicouches lipidiques rencontrées dans les membranes biologiques	24
Figure 10 : Voie de biosynthèse des stérols chez la levure <i>S. cerevisiae</i>	27
Figure 11 : Types de protéines membranaires	28
Figure 12 : Les classes de protéines membranaires présentes dans la membrane plasmique de <i>S. cerevisiae</i>	30
Figure 13 : (A) Structure et relations entre les différents constituants de la paroi de la levure. (B) Association des constituants de la paroi pour former un réseau tridimensionnel et positionnement par rapport à la membrane plasmique	31
Figure 14 : Mouvement possibles d'un phospholipide de membrane	35
Figure 15: Perméabilité d'une double couche lipidique synthétique	37
Figure 16 : Changements typiques associés au diamètre vacuolaire de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> soumise au stress éthanol; (A) : vacuolaire mixte ; (B) : grande vacuole ; (C) : vacuole agrandie	46
Figure 17 : Représentation schématique du phénomène physique de fluorescence	52
Figure 18 : Formules chimiques du DPH (a) et du TMA-DPH (b)	55
Figure 19 : Voie de biosynthèse de l'ergostérol	59

Figure 20 : Schéma du principe de fonctionnement d'un cytomètre en flux	65
Figure 21 : Mise en place du protocole de marquage des levures perméabilisées par l'iodure de propidium. Exemple de résultats obtenus pour une suspension cellulaire comportant 50% de cellules perméabilisées	66
Figure 22 : Suivi de croissance sur moût synthétique (25°C) des différentes souches de <i>S. cerevisiae</i> pendant 7 jours	75
Figure 23 : Effet de la concentration en éthanol (0, 4 et 8%) sur la croissance des 6 souches (WT, $\Delta erg2$, $\Delta erg3$, $\Delta erg4$, $\Delta erg5$, et $\Delta erg6$ correspondance à la figure 1A, 1B, 1C, 1D, 1E et 1F) en conditions aérobies	77
Figure 24 : Evolution des pourcentages de cellules perméabilisées (marquées par l'IP) pour les souches WT et $\Delta erg6$ au cours d'un choc éthanol à 0% (A témoin), 10% (B) et 14% (C) réalisé sur un temps total de 3 heures. Cultures non agitées. Chocs réalisés dans une solution binaire : eau-glycérol	80
Figure 25 : Evolution de la viabilité des levures (méthode UFC) exprimée en pourcentage au cours d'un choc éthanol à 0% (A-témoin), 10% (B) et 14% (C) – 100% correspond à la population initiale (10^6 cellules/mL). Cultures non agitées. Chocs réalisés dans une solution binaire : eau-glycérol	81
Figure 26 : Evolution des pourcentages de cellules perméabilisées (marquées par l'IP) pour les souches WT et $\Delta erg6$ au cours d'un choc éthanol à 0% (A-témoin), 10% (B) et 14% (C). Cultures menées sous agitation. Chocs réalisés dans une solution binaire : eau-glycérol.	83
Figure 27 : Evolution de la viabilité des levures (méthode UFC) exprimée en pourcentage au cours d'un choc éthanol à 0% (A-témoin), 10% (B) et 14% (C) - 100% correspond à la population initiale (10^6 cellules/mL). Cultures menées sous agitation. Chocs réalisés dans une solution binaire : eau-glycérol.	84
Figure 28 : Evolution du pourcentage de cellules perméabilisées (marquées par l'IP) pour les souches WT et $\Delta erg6$ au cours d'un choc éthanol à 0% (A-témoin) ; 16% (B) ; 18% (C) ; 20% (D) ; 30% (E) et 40% (F). Cultures menées sous agitation. Chocs réalisés dans une solution binaire : eau-glycérol.	86
Figure 29 : Viabilité des levures (méthode UFC) exprimée en pourcentage après 60 minutes d'incubation en présence de 0% (A-témoin), 16% d'éthanol (B) et 18% d'éthanol (C). Cultures menées sous agitation. Chocs réalisés dans une solution binaire : eau-glycérol.	87
Figure 30 : Schéma du protocole utilisé afin d'étudier l'évolution de l'intégrité	92

membranaire et de la viabilité au cours du temps après un choc éthanol à 20% pendant 60 minutes.

Figure 31 : Evolution au cours du temps des pourcentages de cellules perméabilisées (marquées par l'IP) pour les souches WT et $\Delta erg6$ au cours d'un choc éthanol à 0% (A) et 20% (B). 93

Figure 32 : Viabilité des levures après 30 et 60 minutes d'incubation en présence de 0% (A) et 20% d'éthanol (B). 94

Figure 33 : Schéma du protocole utilisé pour étudier l'évolution de la fluidité membranaire suite à un choc éthanol à 20% v/v. T° maintenue à 25°C 96

Figure 34 : Evolution au cours du temps de la fluidité membranaire pour les souches WT et $\Delta erg6$ suite à un choc éthanol 20%. Variations exprimées en % par rapport à la valeur initiale d'anisotropie. Les valeurs initiales d'anisotropie sont de 0,284 et 0,263 pour les souches WT et $\Delta erg6$, respectivement 97

Figure 35 : Schéma du protocole mis en œuvre pour le suivi de l'évolution de l'intégrité membranaire et de la viabilité au cours du temps après un choc éthanol à 20% v/v pendant 15minutes. (N.D. : Non déterminé) 98

Figure 36 : Evolution des pourcentages de cellules perméabilisées (marquées par l'IP) pour les souches WT et $\Delta erg6$ sans choc éthanol (A) et après un choc éthanol à 20% de 15 min puis retour à une condition sans éthanol (B). (N.D. : Non Déterminé) 99

Figure 37 : Viabilité des levures (méthode UFC) pour les souches WT et $\Delta erg6$ sans choc éthanol (0%) et après un choc éthanol à 20% - 15 min puis retour à une condition sans éthanol 100

Figure 38 : Schéma du protocole utilisé pour la mesure de la variation de fluidité membranaire au cours du temps après un choc éthanol à 20% pendant 15 minutes. *Le point 45 min correspond à 15 min d'incubation + 30 min de marquage afin de stabiliser le signal; idem pour les temps 60, 75 et 90 min* 102

Figure 39 : Evolution des fluidités membranaires (anisotropie de fluorescence) pour les souches WT et $\Delta erg6$ sans choc éthanol (0%) et après un choc éthanol à 20% de 15 min puis retour à une condition sans éthanol. Les variations d'anisotropie sont exprimées en % par rapport aux valeurs initiales. Les valeurs initiales d'anisotropie sont de 0,284 et 0,263 pour les souches WT et $\Delta erg6$, respectivement 102

Figure 40 : (A) Espèces réactives de l'oxygène (ROS) et systèmes de défense dans 105

le cytosol. (B) Espèces réactives de l'oxygène et systèmes de défense dans les mitochondries

Figure 41 : Schéma du protocole utilisé afin d'étudier l'expression de gènes chez les souches WT et *Δerg6* par RT-qPCR au cours du choc éthanol à 20% v/v pendant 15 min («pulse ») 106

Figure 42 : Niveau d'expression des gènes *AHP1* (A), *CTT1* (B), et *SOD2* (C) chez les souches WT et *Δerg6* par RT-qPCR au cours du choc éthanol à 20% v/v pendant 15 min. Les données sont représentatives de trois essais indépendants. Les niveaux d'expression des gènes sont calculés par rapport aux niveaux d'expression obtenus aux mêmes temps de prélèvement, en absence de choc éthanol. 107

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Composition en phospholipides de la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20
Tableau 2 : Synthèse présentant l'expression globale des gènes identifiés dans la résistance à l'éthanol.	48
Tableau 3 : Différentes méthodes de mesure des propriétés physiques de la membrane	50
Tableau 4 : Génotypes des différentes souches de levures de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> utilisées	58
Tableau 5 : Gènes et amorces utilisées dans la RT-qPCR	71
Tableau 6 : Consommation des sucres et production d'éthanol après 7 jours de fermentation sur moût synthétique	75
Tableau 7 : Effet de l'éthanol dans le milieu de croissance sur la biomasse maximale (24 heures) et sur les taux de croissance (croissance sur milieu MWm à 25°C)	78
Tableau 8 : Viabilité des souches WT et $\Delta erg6$ (méthode UFC) exprimée en log après une heure d'incubation en présence de 0, 20, 30 et 40% d'éthanol. Cultures menées sous agitation. Chocs réalisés dans une solution binaire : eau-glycérol.	88

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique
ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire
ARN : Acide ribonucléique
ATP : adénosine triphosphate
CL : Cardiolipide
CO₂ : Dioxyde de carbone
DO_{600nm} : Densité Optique à 600 nm
DPH : sonde fluorescente 1,6-diphényl-1,3,5-hexatriène
DPH-PA : Acide 3-(4-(6-phényl)-1,2,5-hexatriényl phénylpropionique
DPPC : Dipalmitoylphosphatidylcholine
EDTA : Ethylène-diamine tétra-acétate
ER : Reticulum endoplasmique
ESR : Electron Spin Résonance (Résonance paramagnétique Electronique)
EtOH : Ethanol
FA : Fermentation Alcoolique
FSC : Forward scatter
GPI : Glycosylphosphatidylinositol
H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène
IP : Iodure de propidium
L_α : Phase liquide désordonnée
L_β : Phase lamellaire gel
L_o : Phase liquide ordonnée
MW : Milieu Malt Wickerham
MWm : Milieu Malt Wickerham modifié
PC : Phosphatidylcholine
PCR : Polymérase Chain Réaction (Réaction de polymérisation en chaîne)
PE : Phosphatidyléthanolamine
PG : Phosphatidylglycérol
PI : Phosphatidylinositol
PS : Phosphatidylsérine
QSP : Quantité suffisante pour
RMN: Résonance magnétique nucléaire

RNase : Ribonucléase

ROOH : Peroxydes organiques

ROS : Espèces réactives de l'oxygène

rpm : Rotation par minute

RT-qPCR : PCR Quantitative - transcription reverse

SSC : Side scatter

TMA-DPH : sonde fluorescente 1-[4-(triméthyl-amino)phényl]-6-diphényl-1,3,5-hexatriène

UFC : Unités formant colonies

WT : Wild type (souche sauvage)

Unités

g, mg, μ g : Gramme, Milligramme, Microgramme

h, min, s : Heure, Minute, Seconde

L, mL, μ L : Litre, Millilitre, Microlitre

pb : Paires de bases

v/v : Volume / volume

μ : Taux de croissance (h^{-1})

INTRODUCTION

Avec *Escherichia coli* et *Drosophila melanogaster*, *Saccharomyces cerevisiae* est l'un des organismes modèles centraux pour les études en génétique, biochimie, biologie cellulaire, et plus récemment, en biologie moléculaire et en biologie des systèmes. En fait, nous en savons probablement plus sur la biologie de la cellule de levure que sur tout autre eucaryote. Cela fait de *S. cerevisiae* un organisme modèle idéal pour les études des réponses cellulaires aux stress environnementaux et la tolérance au stress. Par ailleurs, l'étude de *S. cerevisiae* présente également un fort intérêt économique en raison des nombreuses applications industrielles impliquant des levures, comme la brasserie, la vinification, la boulangerie, etc. Plus récemment, la production de biocarburants (dont le bioéthanol) et de molécules à but pharmaceutique ou industriel a été réalisée avec succès par des souches de *Saccharomyces cerevisiae* génétiquement modifiées (Gasch *et al.*, 2000 ; Bisson *et al.*, 2002 ; Stanley *et al.*, 2010c).

Parmi les nombreuses contraintes environnementales rencontrées par la levure dans les applications industrielles, l'exposition à l'accumulation de concentrations en éthanol a probablement le plus d'impact négatif. Lorsque l'éthanol atteint des concentrations toxiques, il a de multiples effets néfastes sur la cellule, entraînant une diminution du taux de croissance, de la vitalité et de la viabilité. Ces impacts conduisent à une baisse de productivité, à des taux sous-optimaux de fermentation, à une production d'éthanol inférieure et finalement, à une baisse de profits pour les industries concernées (Ingram, 1986 ; D'Amore et Stewart, 1987 ; Attfield , 1997 ; Bauer *et al.*, 2000 ; Stanley *et al.*, 2010a). La compréhension des mécanismes de toxicité de l'éthanol est donc un enjeu majeur pour les industries mettant en œuvre des levures fermentaires. Ce phénomène a par conséquent fait l'objet de nombreuses études et il est aujourd'hui généralement admis que la toxicité de l'éthanol est la conséquence de ses actions sur la membrane plasmique de la levure. En particulier, l'exposition à des concentrations élevées d'éthanol serait à l'origine de modifications de fluidité et de perméabilité membranaires, responsables de désordres métaboliques cellulaires importants (Stanley *et al.*, 2010a).

L'objectif général de ce travail est d'approfondir la compréhension de la réponse de la membrane plasmique aux stress éthanoliques chez *Saccharomyces cerevisiae*. Ce travail a été réalisé au sein des laboratoires VAlMiS (Vin Aliment Microbiologie et Stress) et PMB (Procédés Microbiologiques et Biotechnologiques) de l'UMR Procédés Alimentaires et

Microbiologiques, dans l'optique de comprendre les mécanismes impliqués dans la mort ou la résistance cellulaire aux concentrations en éthanol élevées.

La première partie de ce mémoire synthétise la bibliographie consacrée au stress éthanol dans les cellules biologiques. Différents aspects sont abordés tels que les effets de l'éthanol sur la membrane plasmique ainsi que la réponse au stress de l'éthanol chez *Saccharomyces cerevisiae*. Cette première partie se conclut par la présentation des principaux axes du travail de thèse. La seconde partie présente le matériel et les méthodes utilisés au cours de cette étude. La troisième partie est consacrée aux résultats obtenus ainsi qu'à leur discussion. Les résultats de cette étude sont présentés dans deux chapitres principaux, le premier concerne l'étude de l'effet de l'éthanol sur la tolérance et la croissance de *Saccharomyces cerevisiae*. Nous avons comparé une souche Wild type et ses mutants affectés dans la voie de synthèse de l'ergostérol (*Δerg*). Le deuxième chapitre présente les résultats sur l'effet d'un stress éthanol appliqué sous forme de « pulse » (20% v/v d'éthanol - 15 minutes) chez la souche Wild type et un mutant *Δerg6*. Enfin, la conclusion générale reprend de manière synthétique l'ensemble des résultats obtenus afin de souligner les avancées scientifiques réalisées au cours de cette étude. Elle décrit également les perspectives ouvertes par ce travail.

PARTIE 1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

L'objet de la synthèse bibliographique est de présenter un état des connaissances sur les effets d'un stress éthanol sur des cellules biologiques et plus principalement sur la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Cette synthèse se divise en quatre chapitres: le premier chapitre est dédié à la description des changements des compositions et des structures cellulaires lors de perturbations éthanoliques. Le second chapitre est consacré à l'influence de l'éthanol sur la bio-physique cellulaire. Puis les réponses au stress éthanol chez *Saccharomyces cerevisiae* sont décrites. Enfin, les techniques de mesure de l'état des membranes et de leur fluidité sont présentées et discutées dans un dernier chapitre.

CHAPITRE 1 : LA MEMBRANE PLASMIQUE LEVURIENNE

Les levures sont des micro-organismes eucaryotes, ainsi possèdent-elles les caractéristiques structurales propres à ce type cellulaire et d'autres plus spécifiques aux levures elles-mêmes : la paroi cellulaire entoure la membrane plasmique et protège la levure des agressions physico-chimiques du milieu extérieur. Elle est constituée d'une couche externe de mannoprotéines, associés à des glucanes et une couche interne de glucanes associés à une petite quantité de chitine (Fig. 1).

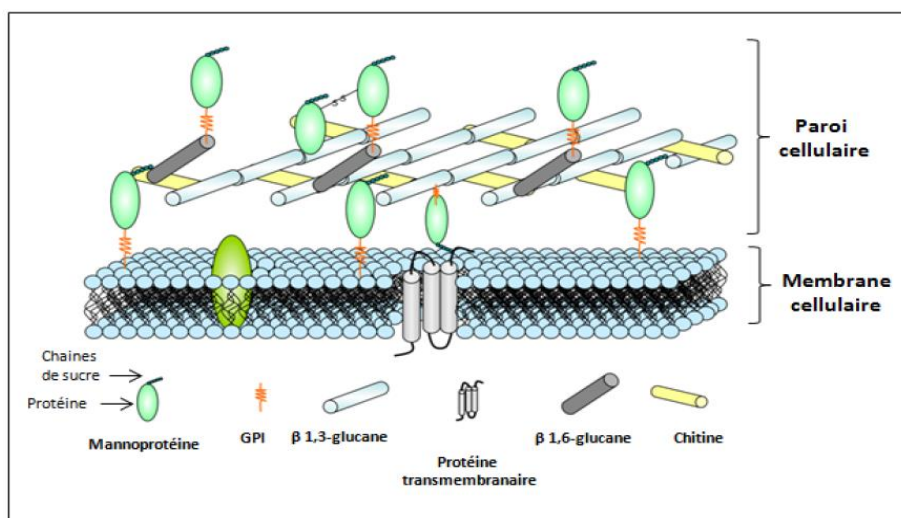


Figure 1 : Représentation schématique de la paroi et la membrane plasmique de *Saccharomyces cerevisiae*. Un arrangement des composants principaux de la paroi cellulaire (mannoprotéines, β -1,3-glucane, β -1,6-glucane et chitine) et de la membrane est représenté (Molina *et al.*, 2000).

La membrane cytoplasmique est composée principalement de phospholipides organisés en double couche (partie hydrophile à l'extérieur et partie lipophile à l'intérieur). Elle contient aussi de nombreux complexes protéiques intrinsèques et extrinsèques dont les rôles sont variés, par exemple des enzymes appelées perméases permettent les transports de substances du milieu extérieur vers le milieu intracellulaire et/ou inversement avec ou non transformation du substrat durant le passage.

Le noyau contient l'information génétique du génome chromosomique de la levure.

Les mitochondries jouent un rôle important dans la respiration aérobie de la levure et la production d'ATP (Fig. 2).

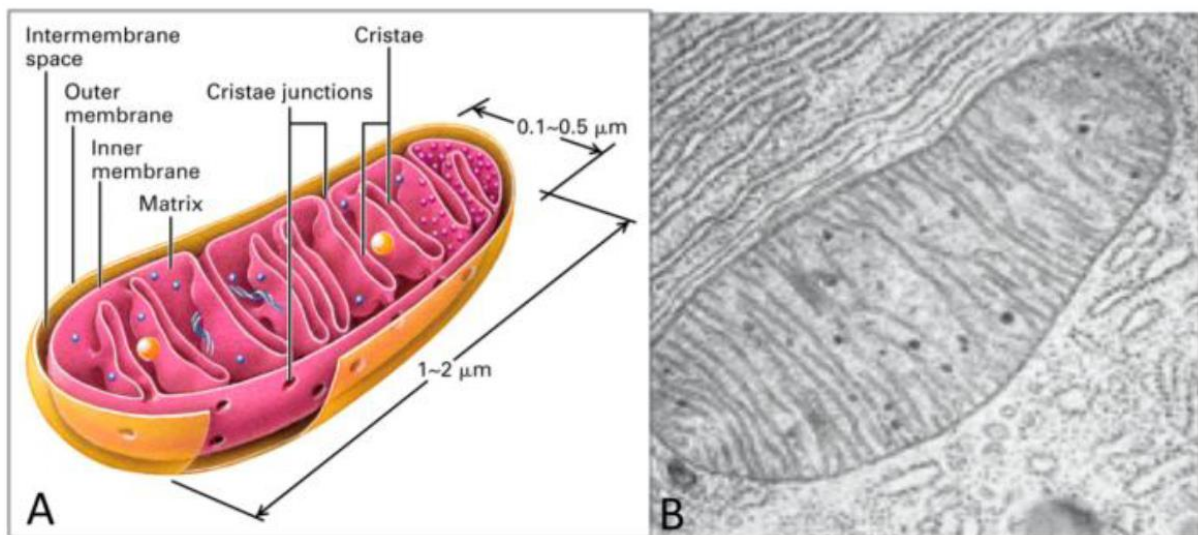


Figure 2 : Représentation schématique de la mitochondrie chez la levure. A) Organisation structurale B) Vue en microscopie électronique, d'après Lodish et al. (2005).

Les membranes biologiques sont des structures complexes, délimitant les cellules et les organites intracellulaires. Leur rôle principal est de permettre des compartimentations. Ainsi, la membrane cytoplasmique sépare les milieux intra et extracellulaires et permet le maintien de compositions différentes entre le cytosol et le milieu externe. Elle assure également les échanges entre les milieux intra et extracellulaires et est le support des enzymes impliquées dans la transduction de signal ou la production d'énergie par exemple.

Les membranes plasmiques des micro-organismes sont une des principales entités qui subissent des dommages pendant les perturbations éthanoliques. La concentration en éthanol, le temps d'application de la perturbation ou la cinétique d'application des stress ont une

influence primordiale sur la survie des cellules. Cela pourrait être dû au fait qu'ils conditionnent les modifications des membranes. Il s'agit là d'une des hypothèses de notre travail. Enfin, les organismes résistants à l'éthanol mettent en place des stratégies de protection de cet organe.

1.1. Structure et fonction de la membrane cellulaire et de la paroi

La membrane cellulaire (ou membrane plasmique) est une barrière sélectivement perméable entre la cellule et son environnement extérieur, d'une épaisseur de 7,5 à 12,5 nm (Fig. 3). Les membranes sont des structures complexes constituées de lipides, de protéines et de sucres (Van der Rest *et al.*, 1995). Parmi les lipides membranaires, les phospholipides ont une importance particulière puisqu'ils forment une double couche lipidique à l'origine de la compartimentation. Cette barrière bloque pratiquement toute diffusion d'ions inorganiques et freine considérablement la diffusion de solutés organiques polaires (sucres, acides aminés...). Seuls, quelques solutés très hydrophobes ou de petite taille comme le CO₂ ou l'éthanol diffusent librement à travers la bicouche. Pour les autres molécules, les échanges de part et d'autre de la membrane sont assurés par les protéines intégrées dans la double couche phospholipidique. Une différence de potentiel électrochimique de part et d'autre de la membrane permet le transport actif d'ions et de solutés. La structure globale des membranes découlant des propriétés et des interactions de ses constituants est ensuite décrite.

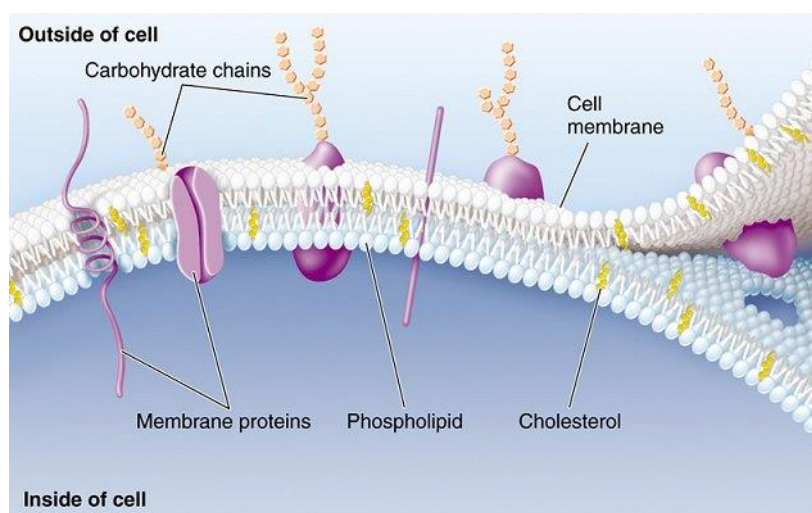


Figure 3 : Représentation schématique d'une membrane biologique d'après

http://www.yellowtang.org/images/key_component_of_bi_c_la_784.jpg

La membrane est organisée sous forme de bicouche, majoritairement phospholipidique (notamment la phosphatidylcholine). Parmi les autres composants de la membrane, on trouve également des glycolipides (lipides portant un groupement glycosylé), des molécules de stérols, des protéines, des glycoprotéines (protéines glycosylées).

La membrane a des propriétés de fluidité et est qualifiée de « mosaïque fluide », ses constituants étant en perpétuel mouvement les uns par rapport aux autres (Singer et Nicolson, 1972 ; Nicolson, 2014). Ce modèle a évolué vers une vision de structure compartimentée avec des microdomaines enrichis en certaines protéines, lipides ou stérols. Les liaisons hydrogènes entre les groupements polaires et les interactions de type Van der Waals entre les chaînes carbonées structurent la bicouche phospholipidique. La fluidité membranaire peut être modifiée par un changement d'environnement, par une modification de la composition moléculaire de la membrane (nature des phospholipides, stérols) ou par l'ajout de molécules interagissant avec la membrane. La fluidité change donc en réponse à des stress environnementaux (facteurs physiques ou chimiques) pour maintenir une fluidité optimale (Woelfel et Roux, 1996 ; Nicolson, 2014).

1.1.1. Lipides membranaires

Les phospholipides, les sphingolipides et les stérols composent principalement la membrane. Leur concentration approche les $5 \cdot 10^6$ molécules de lipides par μm^2 de bicouche lipidique. Les lipides constituent 25 à 50% du poids des membranes. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, environ 60% des acides gras totaux sont les acides gras mono-insaturés palmitoléique (C16:1) (32,3%) et oléique (C18:1) (28%). La membrane contient également des proportions importantes d'acides gras saturés palmitique (C16:0) (12,8%) et stéarique (C18:0) (8%) (Van der Rest *et al.*, 1995). Le contenu de stérols dans les membranes plasmiques est une question controversée (Van der Rest *et al.*, 1995). Bottema *et al.* (1983) ont signalé une proportion molaire entre stérols et phospholipides de 0,365, tandis que Patton et Lester (1991) et Van der Rest *et al.* (1995) ont un rapport de 0,94. La valeur de 0,81 a été obtenue par Rodriguez *et al.* (1985). Ces résultats discordants sont probablement dus aux conditions de croissance de la levure.

1.1.1.1. Les phospholipides

Les phospholipides sont constitués de deux acides gras rattachés à un glycérol, d'un groupement phosphate et d'une tête polaire, variant d'un phospholipide à l'autre. Le groupement phosphate étant chargé négativement, le groupement de tête est souvent positif, rendant la molécule globalement neutre. Néanmoins, ce n'est pas le cas de tous, comme pour la phosphatidylsérine.

Les acides gras hydrophobes et le groupement de tête polaire hydrophile donnent à la molécule un caractère amphiphile, c'est-à-dire à la fois hydrophobe et hydrophile. Les phospholipides s'organisent sous forme de bicouche, les têtes hydrophiles se tournant vers le milieu extracellulaire ou du côté du cytosol, tandis que les queues hydrophobes sont regroupées à l'intérieur.

Les têtes hydrophiles se rapprochent par liaisons hydrogène tandis que les acides gras hydrophobes s'attirent par interactions de Van der Waals, formant une structure sphérique qui donnera la forme définitive à la cellule. Les acides gras sont notamment responsables de la solidité de la membrane, tout en assurant un certain degré de souplesse.

En milieu aqueux, les phospholipides s'organisent de telle sorte que les chaînes d'acide gras minimisent leur contact avec l'eau et optimisent entre les chaînes les interactions hydrophobes. Les têtes polaires des phospholipides sont en interaction électrostatique avec l'eau. Les chaînes d'acides gras s'orientent donc vers l'intérieur, en vis-à-vis, alors que les têtes polaires tapissent les deux faces extérieures. La bicouche est ainsi formée, son épaisseur est bi-moléculaire (4 à 6 nanomètres) et elle s'organise généralement spontanément pour former une vésicule close. Cette tendance à l'organisation des phospholipides est à l'origine de la fabrication des liposomes (Fig. 4) (Huang *et al.*, 1964).

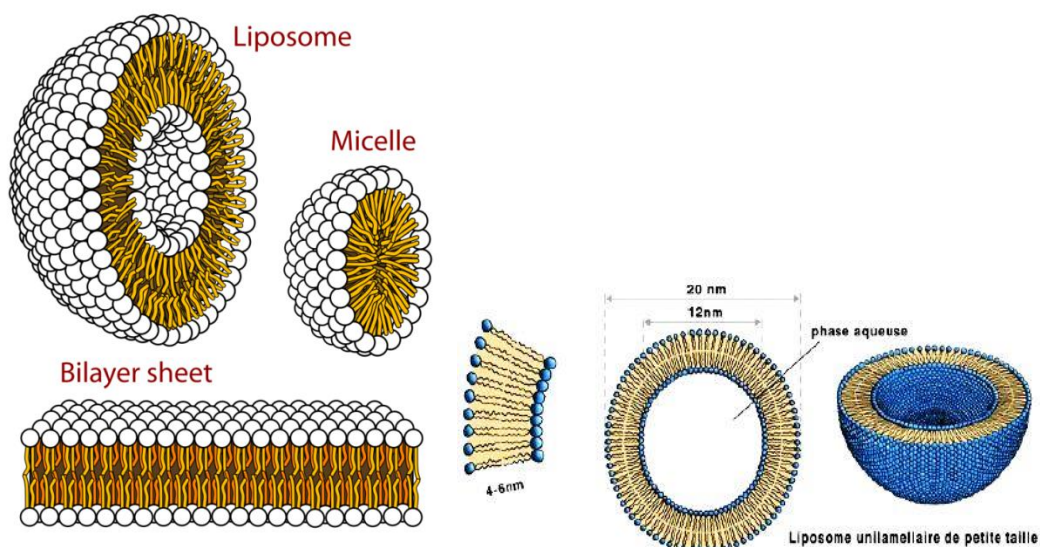


Figure 4 : Représentation schématique d'une coupe transversale de liposome
(diamètre du liposome ≈ 20 nm)

Les lipides sont des triesters de glycérol (sn-glycérol-3-phosphate) dont la fonction alcool du carbone 1 est estérifiée par l'acide phosphorique (constituant la tête polaire hydrophile) tandis que les fonctions alcool des deux autres carbones sont estérifiées par des acides gras (constituant la partie hydrophobe) (Fig. 5).

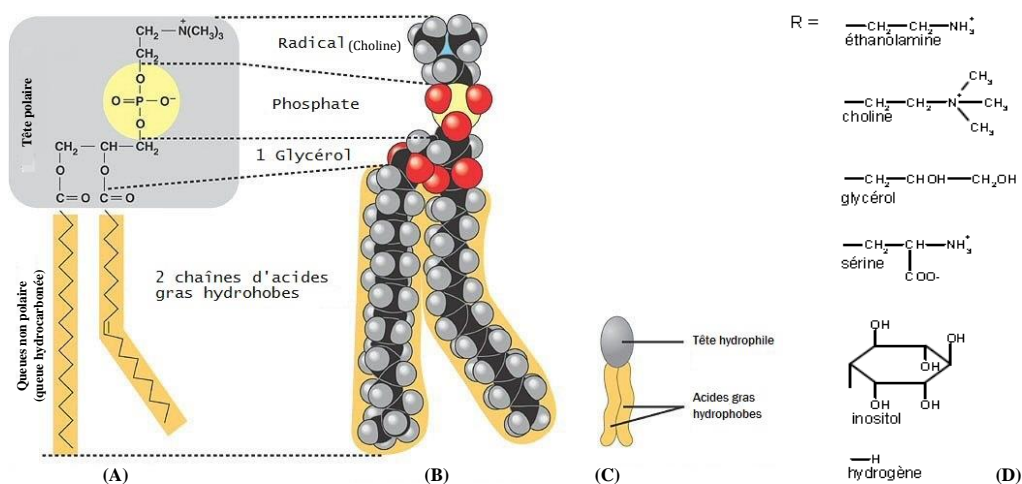


Figure 5 : Structure et composition d'un phospholipide.

(A) schématisation des différentes parties composant le phospholipide avec sa formule chimique,
(B) modèle compact et (C) représentation symbolique, (D) radical d'un phospholipide.

La composition globale en phospholipides de la membrane plasmique apparaît dans le tableau 1. Les phospholipides membranaires sont répartis de manière asymétrique dans les deux monocouches de la membrane plasmique. La monocouche interne est enrichie en phosphatidyléthanolamine, phosphatidylsérine et phosphatidylinositol alors que la monocouche externe est riche en phosphatidylcholine et sphingolipides (Van der Rest *et al.*, 1995). Les chaînes d'acides gras mono-insaturés des phospholipides membranaires représentent à elles seules environ 60% de l'ensemble des chaînes (Van der Rest *et al.*, 1995).

Tableau 1 : Composition en phospholipides de la levure *Saccharomyces cerevisiae*

d'après Zinser *et al.*, 1991.

Lipides	Phospholipides (%)
<i>Phosphatidylcholine</i>	16,8
<i>Phosphatidyléthanolamine</i>	17,7
<i>Phosphatidylinositol</i>	17,7
<i>Phosphatidylsérine</i>	33,6
<i>Cardiolipide</i>	0,2
<i>Acide phosphatidique</i>	3,9
<i>Autres</i>	6,9

Les principaux phospholipides présents dans les membranes de *S. cerevisiae* comprennent la phosphatidylcholine (PC), la phosphatidyléthanolamine (PE), le phosphatidylinositol (PI) et la phosphatidylsérine (PS). Les membranes mitochondriales contiennent également le phosphatidylglycérol (PG) et la cardiolipide (CL). PC est le produit final de la synthèse des phospholipides et est majoritaire dans la membrane de *S. cerevisiae* (Zinser *et al.*, 1991 ; Carman et Henry, 1999 ; Carman et Han, 2011).

1.1.1.2. Les sphingolipides

Les sphingolipides sont des éléments structurant de la membrane et sont des molécules de signalisation importantes. La biosynthèse de sphingolipides montre un cloisonnement

conservé dans les cellules eucaryotes. Leur synthèse commence dans le réticulum endoplasmique et est terminée dans l'appareil de Golgi (Riezman, 2006). Ce sont les lipides dont l'acide gras est lié à une base azotée à longue chaîne (18-20 carbones) par une liaison amide. Ils peuvent représenter jusqu'à 30% des phospholipides totaux et 7% de la masse de la membrane plasmique. Ils sont présents en plus faible quantité dans les mitochondries (Patton et Lester, 1991).

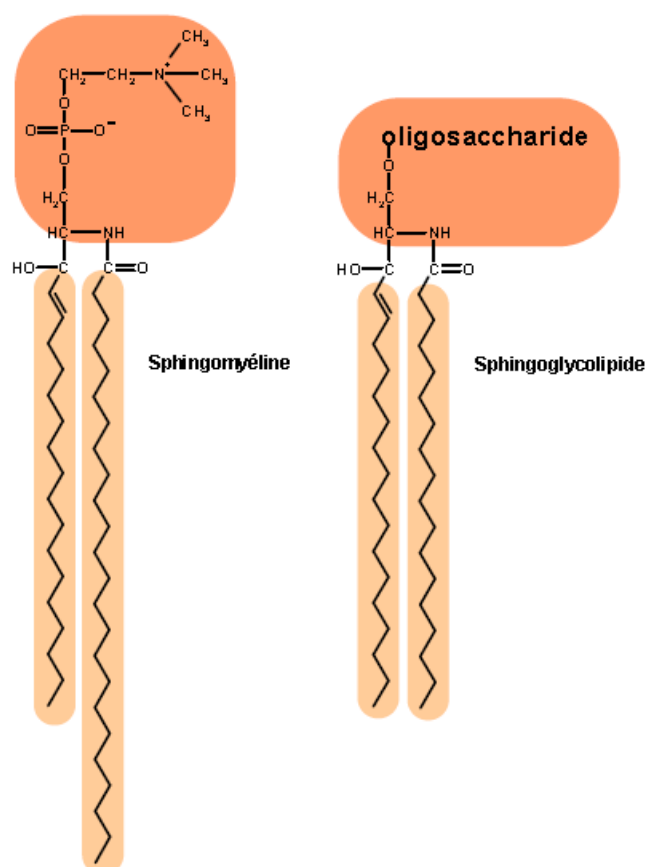


Figure 6 : Représentation schématique des sphingolipides (Mouritsen, 2005)

Les sphingolipides (Fig. 6) ont une base lipidique commune, appelée céramide, constituée d'une longue chaîne amino-alcool (2-amino-1,3-dihydroxy-octadec-4-ène ou sphingosine) connectée à un acide gras par une liaison amide. Associés à des stérols, les sphingolipides joueraient un rôle de médiateurs dans la transduction du signal et le bon adressage à la membrane plasmique de certaines protéines (par exemple : Gas1p, Pma1p, Nce2p) (Dickson *et al.*, 2006). Comme pour les phospholipides, les sphingolipides constituent une famille très nombreuse en raison de la diversité des groupements polaires.

Les sphingolipides sont des constituants ubiquitaires des membranes plasmiques eucaryotes. Chez la levure *S. cerevisiae*, le ratio sphingolipides/phospholipides est de 0,42 (Schneider *et al.*, 1999) et 90% des sphingolipides sont localisés au niveau de la membrane plasmique (Patton and Lester, 1991). L'utilisation d'une souche mutante de levures déficiente pour la synthèse de sphingolipides a montré que ces lipides sont essentiels à la croissance et à la viabilité de la levure *S. cerevisiae* (Wells et Lester, 1983).

1.1.1.3. Les stérols

Les stérols, aussi appelés les alcools stéroïdes, sont un sous-groupe des stéroïdes. Ce sont des constituants essentiels des membranes biologiques. Ils représentent en général entre 0,1 et 1% du poids sec cellulaire (Ratray *et al.*, 1975). Ils sont naturellement présents dans les cellules végétales, animales et fongiques et constituent une classe importante de lipides, assurant plusieurs fonctions essentielles allant de la transduction de signaux à la lipidation des protéines. Les stérols libres ont probablement un rôle structural au sein des membranes, et en modifient ainsi considérablement les propriétés. Ils influenceraient ainsi la fluidité et la perméabilité de la membrane, et par la même occasion l'activité des enzymes membranaires. Les stérols vont condenser les phospholipides et donc diminuer la fluidité de la membrane (Bottema *et al.*, 1985 ; Zinser *et al.*, 1993).

Les stérols diffèrent des autres classes de lipides membranaires par leur structure hydrocarbonée. Ils possèdent un noyau de stérane dont le carbone 3 est porteur d'un groupement hydroxyle (Fig. 7A).

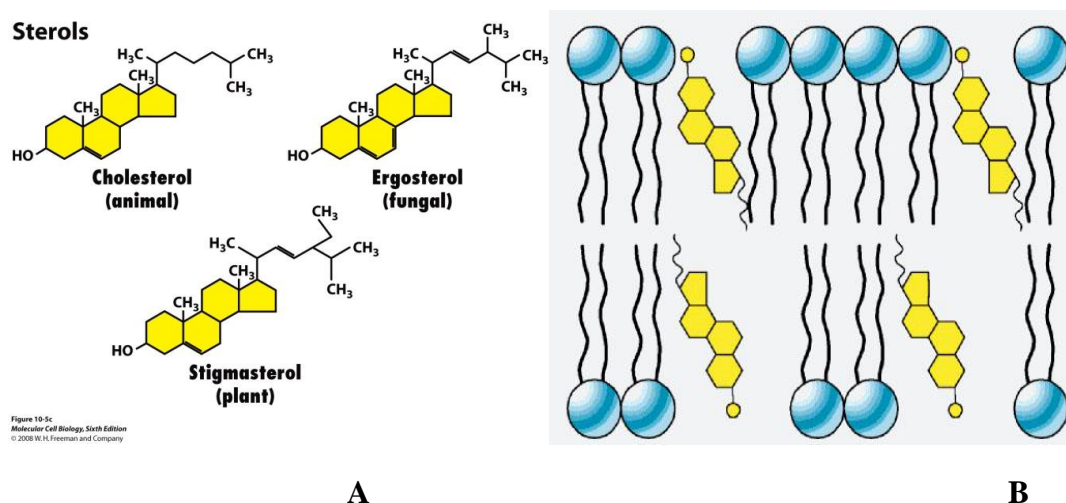


Figure 7 : (A) Formule chimique des différents stérols. (B) Insertion des stérols dans une bicouche lipidique. D'après (<http://www.uic.edu/classes/bios/bios100/lectf03am/cholesterol.jpg>).

Ces molécules sont beaucoup plus compactes et apolaires que les deux classes de lipides décrites précédemment. Les cycles constituant leur squelette leur confèrent une structure plane et rigide et la seule partie polaire de ces molécules est le groupement hydroxyle. Les stérols s'insèrent dans la bicouche lipidique en présentant ce groupement vers l'interface lipide-eau (Fig. 7B).

Les stérols sont synthétisés et maturés dans le réticulum endoplasmique par une cascade de réactions enzymatiques couplées. (Fig. 8)

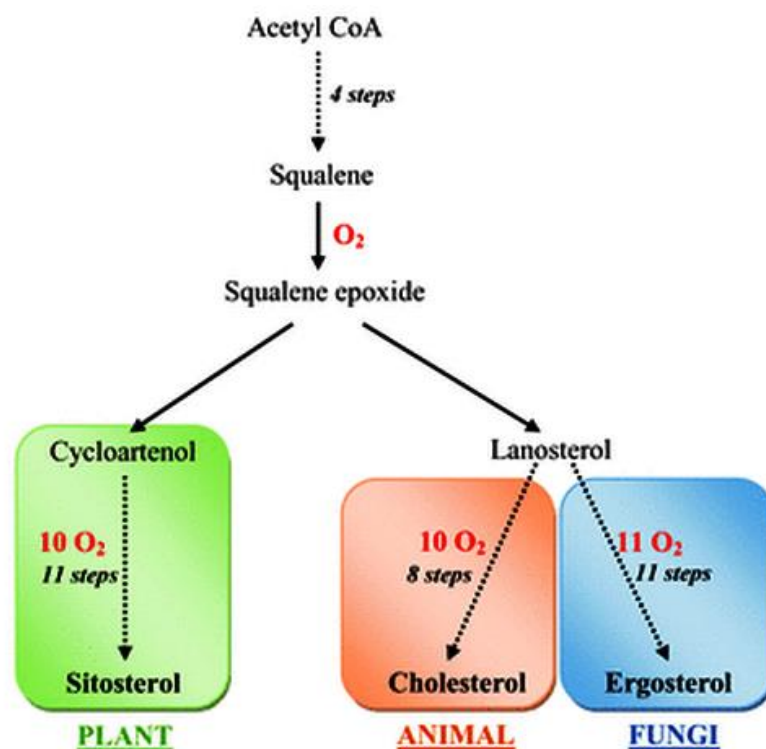


Figure 8 : Voie de synthèse des stérols dans les plantes, les animaux et les champignons (d'après Dupont *et al.*, 2012).

La structure précise et la concentration des stérols dans les membranes eucaryotes affectent les fonctions membranaires associées, y compris la formation de vésicules et le triage des protéines, la fusion membranaire homotypique, l'activité des enzymes membranaires intégrées, l'agrégation latérale entre protéines et lipides et la perméabilité aux ions de la barrière membranaire (Jacquier et Schneiter, 2012). Pour les trois règnes, une voie précoce et commune permet la synthèse du squalène époxyde. Le cycloarténol est produit dans les plantes tandis que le squalène époxyde donne le lanostérol chez les cellules animales et fongiques. Les produits finaux des voies métaboliques sont le sitostérol, le cholestérol et

l'ergostérol pour les plantes, les cellules animales et les cellules fongiques, respectivement (Dupont *et al.*, 2012). Les organismes eucaryotes peuvent synthétiser des stérols, alors que les bactéries et les algues n'en synthétisent pas et n'en ont pas besoin pour leur croissance. L'ergostérol est généralement considéré comme le principal stérol chez les champignons. L'ergostérol présent à plus de 90% est le principal stérol libre chez la levure (Rattray *et al.*, 1975). Les levures et autres champignons utilisés dans les fermentations industrielles permettent de produire aisément de l'ergostérol, utilisé comme pro-vitamine D ou précurseur de la synthèse de stéroïdes cliniquement importants (Hendrix, 1970).

Rôle des stérols dans le polymorphisme lipidique

La conformation des lipides et la fluidité de la bicouche sont influencées par la présence de stérols dans la membrane (Parasassi *et al.*, 1994a; Parasassi *et al.*, 1994b). Par exemple, le cholestérol est un constituant majeur des membranes des cellules animales. En raison de sa nature chimique, il se localise dans la bicouche lipidique au niveau des chaînes d'acides gras. Grâce à sa position, il agit comme un tampon et minimise les variations de fluidité membranaire induites par des modifications des paramètres environnementaux dans les membranes modèles. Il augmente la fluidité des phases gel et diminue celle des phases liquides cristallines (Fig. 9) (Arora *et al.*, 2004).

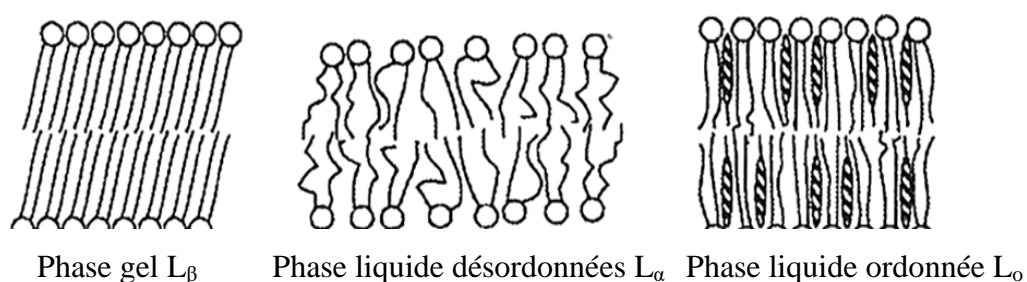


Figure 9 : Structures des bicouches lipidiques rencontrées dans les membranes biologiques. Dans certaines conditions (basses températures, faible hydratation) les phospholipides peuvent adopter une phase gel. La présence de cholestérol (formes hachurées) ordonne la phase liquide ou fluidifie la phase gel pour donner une phase liquide ordonnée (d'après Munro (2003)).

Donc, le ratio phospholipides/cholestérol est un des facteurs majeurs qui contrôle la fluidité membranaire des membranes biologiques. Dans les membranes modèles de composition multiple, lorsqu'il est présent à une concentration suffisante (24-30 mol%), il a la capacité d'induire la formation de domaines dans lesquels la conformation des lipides est qualifiée de liquide ordonnée L_o (Fig. 9) (Feigenson et Buboltz, 2001 ; Dietrich *et al.*, 2001 ; Loura *et al.*, 2001). La formation de liaisons faibles entre lipides pourrait être à l'origine de la constitution de ces domaines. En effet, les stérols sont des molécules majoritairement apolaires qui nécessitent d'être recouvertes par les têtes polaires des phospholipides pour minimiser leurs contacts avec l'eau. A une concentration proche de la concentration limite de solubilité dans la bicouche phospholipidique, les molécules de stérols se regroupent à intervalles réguliers dans la bicouche (Parker *et al.*, 2004). Chez de nombreuses cellules eucaryotes, l'existence de zones enrichies en stérols dans la membrane plasmique est très probable (Baumann *et al.*, 2005 ; Klima et Foissner, 2008). Ces zones, dont les dimensions varient de quelques dizaines à quelques centaines de nanomètres auraient la particularité de dériver latéralement dans le continuum membranaire, constituant ainsi la base structurale de « radeaux » lipidiques (Klima et Foissner, 2008). Les fonctions de ces domaines membranaires riches en stérols ne sont pas encore élucidées.

Les stérols levuriens

Les teneurs en stérols de la levure vont dépendre de la disponibilité de l'oxygène, des conditions de culture dont la température, du milieu de culture et bien sûr de la souche utilisée (Parks, 1995). Le principal facteur influençant la composition en stérols est l'aération. L'ergostérol n'est pas synthétisé en anaérobiose, la présence d'ergostérol dans le milieu est donc essentielle pour assurer une croissance. En effet, l'oxygène intervient au niveau de :

- la régulation de la transcription des enzymes intervenant dans la conversion du 3-hydroxy-3methyl-glutaryl CoA en acide mévalonique ;
- la cyclisation du squalène en lanostérol ;
- la déméthylation et désaturation du lanostérol en ergostérol (Aries et Kirsop, 1977 ; Aries et Kirsop, 1978).

S. cerevisiae produit son principal stérol, l'ergostérol, d'une manière dépendante de l'oxygène, principalement dans le reticulum endoplasmique (ER). En conditions aérobies, la levure ne peut pas importer de stérols externes, à moins qu'elle soit porteuse de mutations dans la synthèse de l'hème ou dans le contrôle transcriptionnel de la synthèse de l'ergostérol (Souza et Pichler, 2007). Lorsque l'oxygène est limitant pour la synthèse de l'ergostérol, la levure utilise des stérols exogènes. Chez la levure, comme chez les eucaryotes supérieurs, les stérols libres sont enrichis le long de la voie de sécrétion et sont les plus abondants dans la membrane plasmique. Les stérols synthétisés en excès peuvent être acylés et stockés sous forme d'esters de stéroïde en particules lipidiques, d'où ils peuvent être mobilisés, si nécessaire, pour la formation de la membrane (Souza et Pichler, 2007).

Voie de biosynthèse des stérols chez la levure *S. cerevisiae*

La voie de biosynthèse de l'ergostérol peut être divisée en deux grandes parties: la première est la synthèse du squalène à partir de l'acétyl-CoA et la seconde est la conversion du squalène en ergostérol (Fig. 10). La première partie de la biosynthèse de l'ergostérol commence à partir de la condensation de molécules d'acétyl-CoA pour donner du mévalonate (voie du mévalonate). Le squalène est formé par le couplage de deux Farnésyl Pyrophosphate (FPP) à partir duquel s'engage l'étape de formation de l'ergostérol (Souza et Pichler, 2007). Lors de l'oxydation du squalène, des stérols ayant des caractéristiques structurales sont formés suite à un certain nombre d'événements de cyclisation. Dans la plupart des souches étudiées, l'ensemble des réactions impliquées dans la voie de biosynthèse des stérols est essentiel. Toutes mutations ou délétions des gènes impliqués dans cette voie sont létales pour la levure (Souza et Pichler, 2007).

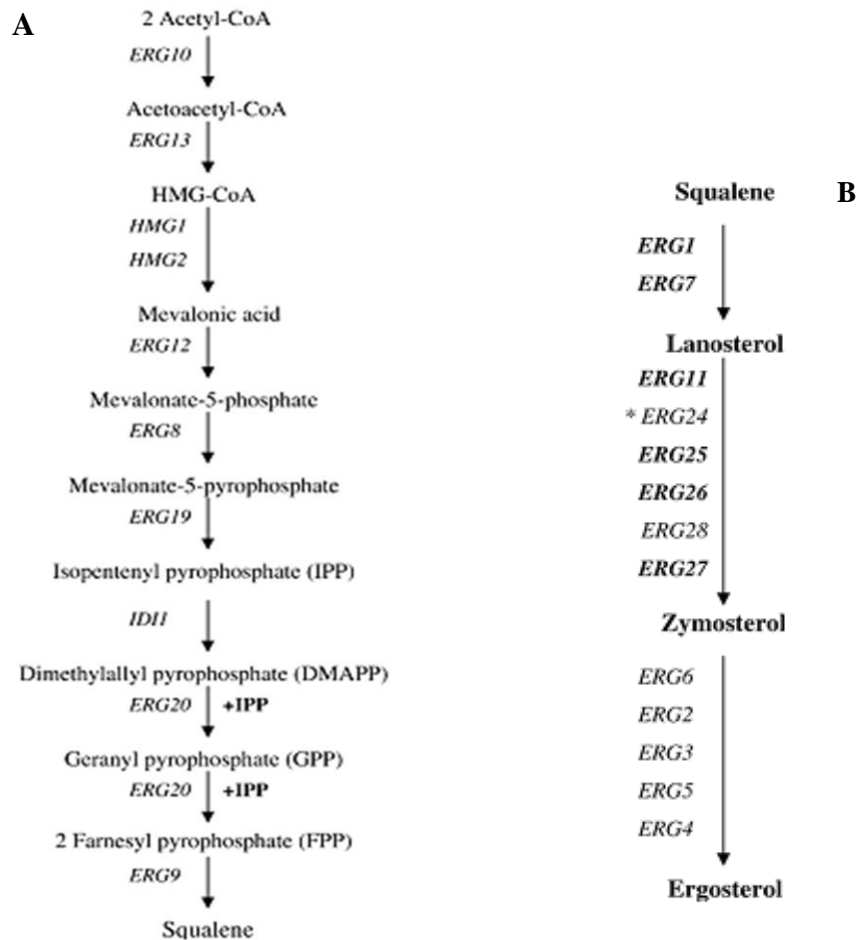


Figure 10 : Voie de biosynthèse des stérols chez la levure *S. cerevisiae* (Souza et Pichler, 2007)

(A) Formation du squalène à partir de l'acétyl-CoA. Les gènes codant pour les enzymes sont indiqués en italique.

(B) Synthèse de l'ergostérol à partir du squalène. Les gènes codant pour les enzymes respectives sont indiqués en italique. Les gènes essentiels sont en caractères gras. **ERG24* est essentiel dans certaines conditions de croissance.

1.1.2. Les protéines membranaires

En plus des lipides, la membrane plasmique est constituée de protéines. Les protéines membranaires peuvent être très abondantes au niveau de certaines membranes. Les protéines membranaires jouent des rôles essentiels et assurent des fonctions spécifiques au niveau des membranes biologiques. Un de leurs rôles principaux est le passage de molécules au travers des membranes. En plus de leur rôle fonctionnel, les protéines membranaires ont également un rôle structural. Elles ont une influence importante sur la fluidité des membranes (D'Antuono *et al.*, 2000).

Les protéines membranaires se classent en deux grandes catégories : les protéines intrinsèques (intégrales ou transmembranaires) et les protéines extrinsèques (ou périphériques) (Fig. 11).

Les protéines intrinsèques sont associées à la membrane de manière plus étroite par un ensemble d'interactions hydrophobes avec les parties apolaires des lipides. Les protéines intrinsèques traversent la membrane de part et d'autre. Leurs séquences hydrophobes leur permettent d'être dissoutes au cœur de la bicouche. La partie de la protéine qui traverse la membrane a le plus souvent une conformation α -hélicoïdale. Dans certains cas, les masses protéiques affleurent en dehors de la membrane soit d'un côté, soit des deux (protéines transmembranaires); dans d'autres cas, la quasi-totalité de la protéine est localisée dans la bicouche lipidique (Cascio, 2005). Ce sont des protéines transmembranaires dont la chaîne est accessible des deux côtés de la membrane. Leur disposition dans la membrane leur permet de participer à des transformations et des réactions qui s'effectuent de part et d'autre de la membrane. Ce sont ces protéines qui permettent le transport de matière, le couplage énergétique et le transfert d'informations. Elles peuvent également servir de liens structuraux entre le cytosquelette de la cellule et la matrice extracellulaire ou de récepteurs recevant et convertissant des signaux chimiques qui proviennent de l'environnement de la cellule (Alberts *et al.*, 2012).

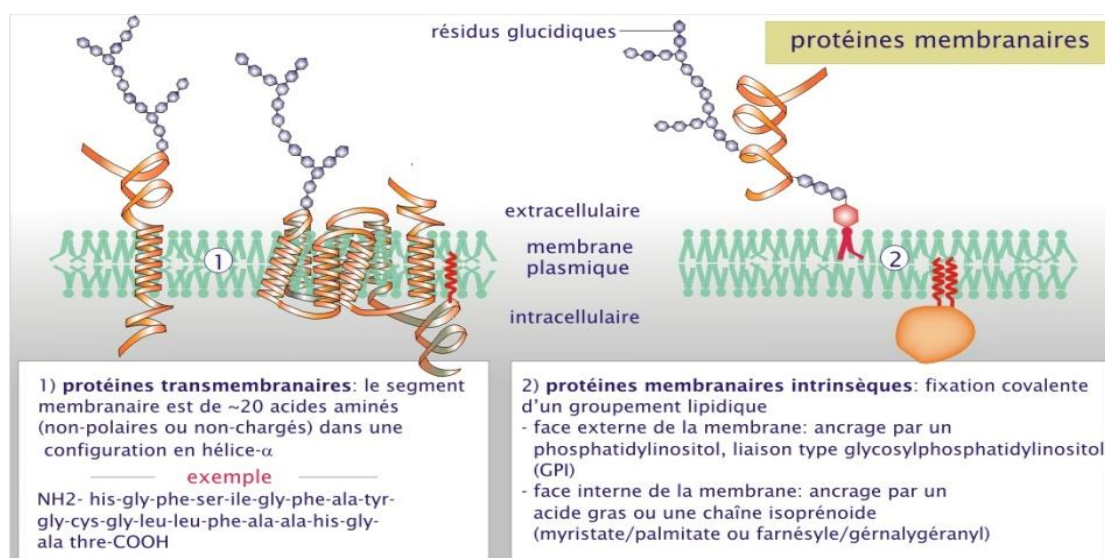


Figure 11 : Types de protéines membranaires

(http://ressources.unisciel.fr/biocell/chap1/res/img139-2_1.jpg)

Les protéines extrinsèques ne sont associées à la membrane que de manière relativement faible par des interactions électrostatiques avec les parties polaires des lipides ou les parties polaires des protéines intrinsèques qui émergent hors de la membrane. Les protéines

périphériques, ou extrinsèques, sont quant à elles associées à la membrane par des interactions électrostatiques faibles (hydrogène ou Van der Waals). Elles sont donc en contact avec le milieu aqueux et possèdent des caractéristiques structurales semblables à celle des protéines globulaires solubles. Elles peuvent être également associées aux têtes polaires des phospholipides ou aux protéines intrinsèques sur l'une ou l'autre face de la membrane. Leur localisation leur permet de participer à des réactions qui s'effectuent à l'interface entre la membrane et le compartiment aqueux. Des protéines peuvent être également localisées à l'extérieur de la bicouche mais ancrées dans la membrane par liaison covalente à une molécule de glycosylphosphatidylinositol (GPI) (Alberts *et al.*, 2012).

Les protéines extrinsèques et intrinsèques, par leurs interactions avec les parties apolaires ou polaires des lipides membranaires, peuvent influencer le polymorphisme lipidique. Selon leur nature chimique et leur structure, les protéines membranaires ont une influence majeure sur la fluidité membranaire (D'Antuono *et al.*, 2000) et en fonction de leur nature, elles peuvent faire augmenter, diminuer la température de transition de phase ou encore faire disparaître ce phénomène (Tomczak *et al.*, 2003).

De même, l'environnement lipidique influence l'activité des protéines membranaires. Par exemple, la fluidité membranaire a une influence directe sur la conformation du site actif de certaines enzymes membranaires, ce qui résulte en une modification de l'énergie d'activation de ces enzymes lorsque la membrane est plus fluide (McMurchie et Raison, 1979 ; Pomeroy et Raison, 1981).

Les protéines membranaires de *Saccharomyces cerevisiae*

Les lipides membranaires de la levure jouent un rôle important dans l'activité des protéines membranaires. Par exemple, la délipidation de l'ATPase membranaire entraîne son inactivation (Dufour et Goffeau, 1980) et cette enzyme a besoin de lipides dont la partie polaire est chargée négativement et dont les chaînes hydrophobes sont insaturées pour fonctionner de manière optimale (Serrano, 1991). Le nombre de protéines différentes au niveau de la membrane plasmique de *S. cerevisiae* est estimé à environ 150. La majeure partie de ces protéines correspond à des protéines de transport. (Rank et Robertson, 1983). En effet, la membrane plasmique d'une cellule contient 10^5 à 10^6 protéines de transport. Les protéines

membranaires sont impliquées dans la synthèse de la paroi, la transduction de signal ou font partie du cytosquelette de la levure (Fig. 12) (Van der Rest *et al.*, 1995).

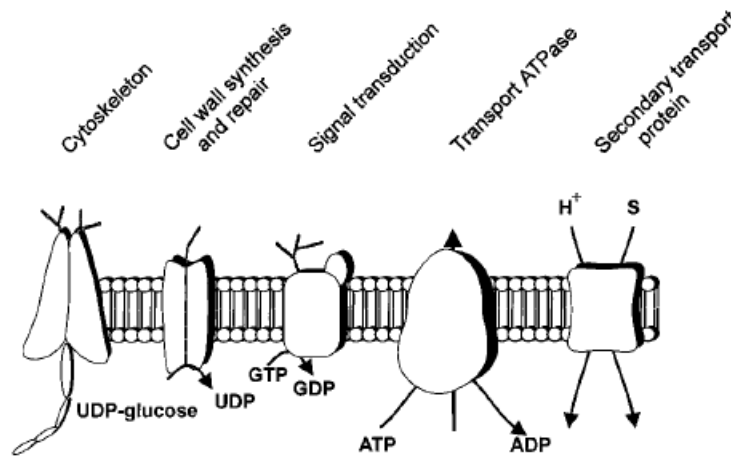


Figure 12 : Les classes de protéines membranaires présentes dans la membrane plasmique de *S. cerevisiae*

1.1.3. La paroi de la levure

Une des particularités de l'enveloppe de la levure *S. cerevisiae* est que la membrane plasmique est entourée d'une paroi élastique avec laquelle elle possède de nombreux points d'ancrage. La paroi maintient la structure et la rigidité de la cellule.

La paroi est constituée de deux couches distinctes visibles en microscopie électronique. La couche interne a une épaisseur d'environ 200 nm et est essentiellement constituée de β -glucanes et de chitine. Elle confère ses propriétés mécaniques à la paroi. La couche externe est constituée de mannoprotéines hautement glycosylées qui émanent à la surface de la cellule et sont impliquées entre autres dans la fonction de reconnaissance entre cellules. Elle limite également l'accessibilité de la couche interne à des enzymes présentes dans le milieu extracellulaire (Klis *et al.*, 2002). La structure de la paroi est présentée Figure 13.

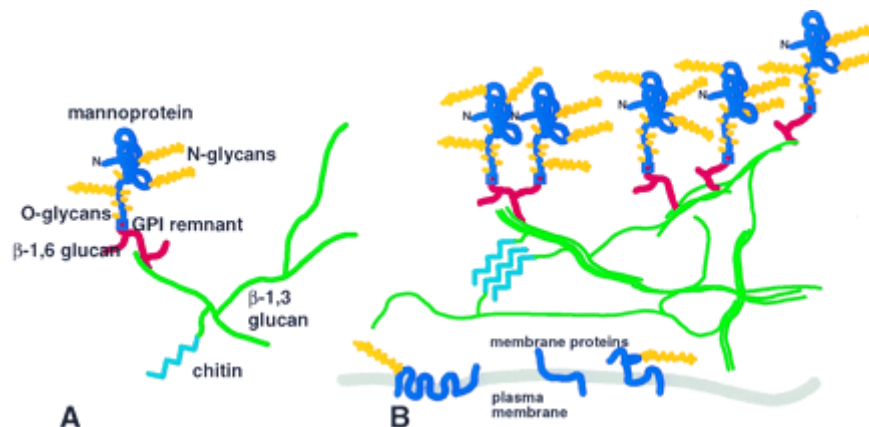


Figure 13 : (A) Structure et relations entre les différents constituants de la paroi de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Les mannoprotéines (bleu foncé) sont associées à des oligosaccharides (jaune) et sont reliées par l'intermédiaire de β -1,6 glucanes (rouge) au réseau de β -1,3 glucanes (vert) et de chitine (bleu clair). **(B) Association des constituants de la paroi pour former un réseau tridimensionnel et positionnement par rapport à la membrane plasmique** (Lipke et Ovalle, 1998).

Au pH physiologique, la surface externe de la paroi est chargée négativement et est très hydrophile. La paroi étant élastique, elle permet à des cellules transférées dans un milieu hyperosmotique de se contracter rapidement. Son élasticité lui est conférée par le réseau tridimensionnel de β -1,3-glucanes (Lipke et Ovalle, 1998). Donc la membrane plasmique et la paroi restent solidaires lors d'une telle contraction (Slaninova *et al.*, 2000). La construction de la paroi est un processus très régulé. C'est donc une structure dynamique qui s'adapte continuellement à son environnement. La composition et l'organisation structurale de la paroi peuvent varier de manière importante en réponse à des modifications de l'environnement (variations du pH, de la température, de la concentration en nutriments...). Cependant, les modes de régulation sont encore très peu connus (Klis *et al.*, 2002).

1.2. Effet de la structure des lipides sur les propriétés membranaires

1.2.1. Asymétrie de la bicouche lipidique

En 1972, la membrane plasmique a été décrite selon le modèle de la "mosaïque fluide" par Singer et Nicholson (Singer et Nicholson, 1972). Il convient cependant de noter que ce modèle, basé sur une structure homogène des phases lipidiques apparaît aujourd'hui comme trop

simplifié. Un grand nombre d'études réalisées depuis ont montré que les membranes biologiques présentent une structure beaucoup plus complexe et hétérogène (Nicolson, 2014).

Les membranes cellulaires sont en général asymétriques : leur face interne, à l'intérieur de la cellule ou de l'organite, est très différente de leur face externe. Les deux moitiés de la bicouche contiennent souvent des sélections très différentes de phospholipides et de glycolipides. De plus, les protéines sont incluses dans la bicouche avec une orientation particulière, essentielle pour leur fonction. Les protéines intrinsèques ne sont pas symétriques et les protéines extrinsèques sont différentes des deux côtés de la membrane. De même, les lipides polaires ne sont pas répartis de manière équivalente sur les deux couches de la membrane et on parle de l'asymétrie de distribution des lipides. Cette asymétrie des lipides s'établit dès leur synthèse. Le mécanisme de flip-flop (diffusion transversale des lipides) est un processus trop lent pour pouvoir expliquer cette distribution asymétrique et d'autres mécanismes interviennent. Le mieux caractérisé est le transport spécifique des aminophospholipides (*phosphatidyléthanolamine* et *phosphatidylsérine*) de la monocouche externe vers la monocouche interne par une protéine, l'aminophospholipide-translocase (Seigneuret *et al.*, 1984).

1.2.2. Fluidité membranaire

La fluidité d'une membrane se définit comme la facilité avec laquelle les constituants se déplacent au sein de celle-ci. La fluidité membranaire est directement impactée par la nature de ces constituants, ainsi que par certains facteurs extrinsèques. Sous l'effet de l'éthanol, la bicouche lipidique subit une transition de phase faisant apparaître des zones d'interdigitation des deux feuillets, réduisant significativement son épaisseur. Ce phénomène induit une augmentation de la fluidité membranaire de la levure (Alexandre *et al.* 1994; Le Marois, 2013).

1.2.2.1. Propriétés de fluidité membranaire

A la température physiologique, la structure de la membrane biologique n'est ni liquide ni solide. Cet état particulier de la matière est appelé cristal liquide (Beney et Gervais, 2001) : «cristal» car l'édifice est hautement organisé et «liquide» car il confère à la membrane sa fluidité. La bicouche lipidique constitue à la fois une structure suffisamment solide pour maintenir l'intégrité cellulaire mais aussi assez fluide pour permettre les mouvements des protéines transmembranaires et membranaires et d'autres molécules. Les différents éléments de la membrane bougent les uns par rapport aux autres. La cohésion de la bicouche est assurée par deux types d'interactions :

- les liaisons hydrogènes : entre les parties polaires, soit directement entre les phospholipides, soit par l'intermédiaire de molécules d'eau ;
- les interactions de type Van der Waals entre les chaînes carbonées.

L'environnement aqueux à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule empêche les lipides de la membrane de s'échapper de la bicouche, mais rien n'empêche ces molécules de se déplacer et d'échanger leur place entre elles, dans le plan de la bicouche. La membrane se comporte donc comme un fluide bidimensionnel, d'une importance primordiale pour la fonction membranaire. Cette propriété est différente de la flexibilité qui est la capacité de la membrane à se courber (Maillet, 2006).

La fluidité des bicouches lipidiques peut être étudiée en utilisant des bicouches lipidiques synthétiques qui sont facilement produites par l'assemblage spontané en bicouche des molécules de lipides amphiphiles dans l'eau. Ces bicouches artificielles simples permettent les mesures délicates des mouvements des molécules de lipides, montrant que certains de ces mouvements sont rares alors que d'autres sont fréquents et rapides (Alberts *et al.*, 2012).

Elle permet aux protéines membranaires de diffuser rapidement dans le plan de la bicouche et d'interagir les unes avec les autres, ce qui est capital dans la signalisation cellulaire, par exemple. Elle permet aux lipides membranaires et aux protéines de diffuser des sites où ils sont insérés après leur synthèse vers d'autres. Elle permet également d'assurer que les molécules membranaires sont réparties de manière égale entre les cellules filles lors de la division cellulaire (Maillet, 2006).

Les interactions qui stabilisent le cœur de la membrane concernent les parties apolaires des constituants membranaires, il s'agit de liaisons électrostatiques de type Van der Waals, qui sont beaucoup moins fortes que les liaisons qui unissent les têtes polaires. Elles varient fortement avec la distance entre les molécules (la force de l'interaction est inversement proportionnelle à la distance puissance douze).

Les principaux facteurs agissant sur ces interactions sont :

- la présence de chaînes insaturées car la présence de doubles liaisons principalement de configuration *cis* a pour effet d'écarter les chaînes hydrocarbonées et donc de diminuer les interactions de Van der Waals.
- la présence de stérols qui s'intercalent dans la membrane et ont tendance à en diminuer la fluidité. La configuration plane et volumineuse du noyau stéroïde et sa rigidité tend à compresser les chaînes aliphatiques des lipides environnants ce qui augmente la force des liaisons entre ces chaînes (Bottema *et al.*, 1985). Cet effet se répercute jusqu'au carbone C8 des phospholipides. Au-delà de ce carbone, la courte chaîne aliphatique des stérols va avoir tendance à augmenter la fluidité entre les chaînes des phospholipides adjacentes. Cet effet est plus important lorsque la chaîne du stérol est insaturée (comme c'est le cas chez l'ergostérol qui est le principal composant stéroïde de la membrane de *S. cerevisiae* ou le stigmastérol) en comparaison avec une chaîne linéaire (comme chez le cholestérol ou le campestérol). La présence d'ergostérol a donc tendance à rigidifier la membrane.
- les lipides à longue chaîne diminuent la fluidité de la membrane. En effet, plus la chaîne aliphatique des phospholipides est longue, plus les interactions de Van der Waals sont importantes et rigidifient la membrane.

1.2.2.2. Mouvement des phospholipides

Les lipides de membranes sont animés de mouvements divers, plus ou moins importants et rapides en relation avec la fluidité des couches huileuses d'acides gras. On peut ainsi observer des mouvements de balancier des chaînes hydrocarbonées et de rotation ou de translation des têtes (Fig. 14). Ces mouvements sont importants, surtout dans la mesure où ils facilitent les insertions et donc, le renouvellement ainsi que les mouvements de diffusion latérale des protéines dans les membranes (Vernier, 2006).

La viscosité, propriété inverse de la fluidité, représente la résistance au déplacement. La viscosité moyenne d'une membrane est 100 fois plus élevée que celle de l'eau pure. Cependant, les membranes sont des milieux anisotropes et la résistance aux mouvements n'est pas identique dans toutes les directions et à tous points de la membrane. Les différents mouvements locaux qui procurent aux bicouches lipidiques leur fluidité sont illustrés sur la Figure 14 (Lodish *et al.*, 2005 ; Vernier, 2006).

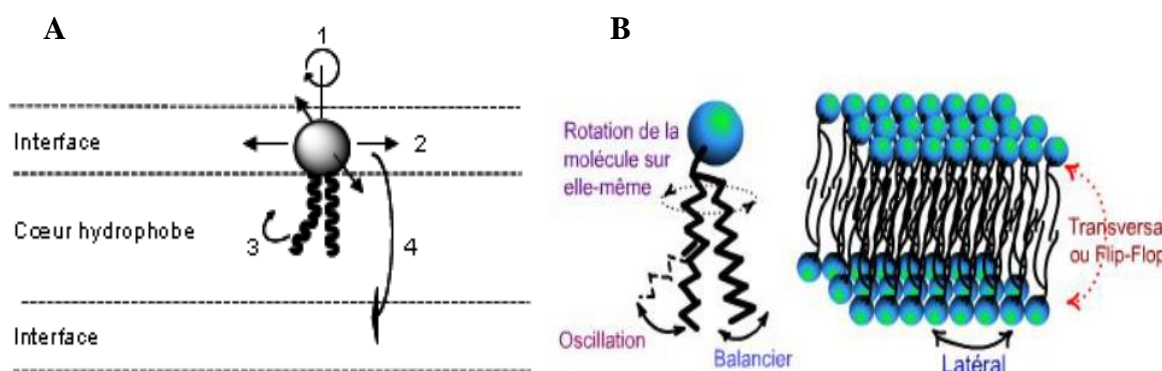


Figure 14 : Mouvement possibles d'un phospholipide de membrane

(A) (Vernier, 2006) : 1- rotation de la molécule sur elle-même, 2- translation, 3- mouvements des chaînes acyles et 4- flip-flop ; (B) <http://www.espaceciences.com/BioMb/topo/ndev/cours.htm>

Les lipides se déplacent perpétuellement dans le plan de la membrane et tournent sur leur axe. Les chaînes hydrocarbonées sont aussi animées d'un mouvement de balancier. Tous les mouvements de translation et de rotation sont très rapides (temps de corrélation $\sim 10^{-10}$ - 10^{-11} s). La diffusion transversale des lipides (ou flip-flop) est beaucoup plus lente que la diffusion latérale. Les lipides peuvent passer d'une bicouche à l'autre. Le passage à travers la membrane est fortement dépendant de la taille et de la charge de la tête polaire qui doit traverser le cœur hydrophobe de la bicouche (Bai et Pagano, 1997).

1.2.3. Perméabilité

Les membranes cellulaires permettent le maintien du contenu cellulaire dans un espace structuré et confiné, tout en permettant les échanges moléculaires avec le milieu, nécessaires à l'activité métabolique. Certaines molécules franchissent la membrane par le simple fait du différentiel de concentration : il s'agit de la diffusion passive. Lorsque les molécules transitent selon ce mécanisme par des structures protéiques, il s'agit de diffusion facilitée. Enfin, les

cellules retiennent certains solutés et maintiennent des différentiels de concentration transmembranaires par le transport actif ou la perméabilité active.

Les membranes ont donc une perméabilité sélective vis-à-vis des différentes molécules, ce qui fait que la cellule peut ajuster et maintenir sa composition interne. Seules quelques petites espèces moléculaires peuvent diffuser librement à travers les bicouches phospholipidiques. Certaines molécules non polaires, comme O_2 et CO_2 , sont solubles dans la bicouche lipidique et passent rapidement d'une face à l'autre de la membrane. Certaines molécules polaires non chargées, si elles sont de petites tailles, comme H_2O , diffusent également à travers la membrane. Les molécules chargées, notamment les ions, ne traversent jamais une membrane, quelle que soit leur taille, puisque même les ions H^+ ne franchissent pas la bicouche lipidique par diffusion. La membrane est donc une barrière très efficace. Mais elle peut facilement être franchie par des molécules plus hydrophobes telles que les alcools. Les propriétés de perméabilité d'une double couche lipidique artificielle sans protéines sont indiquées ci-dessous (Fig. 15).

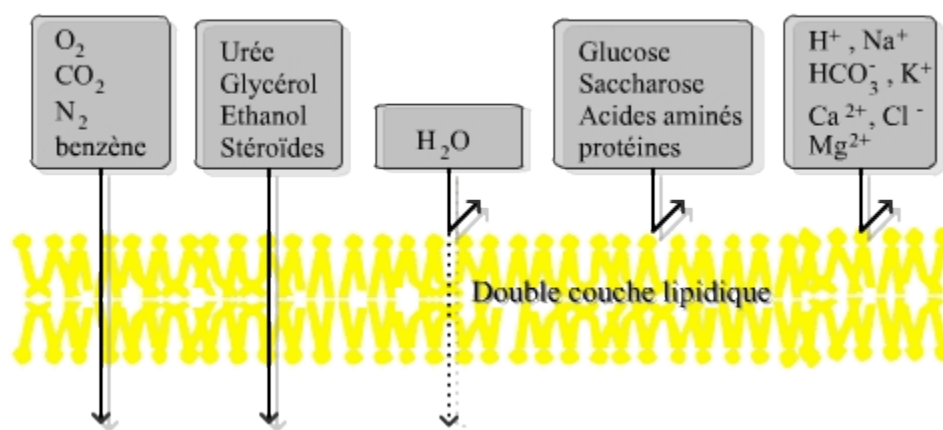


Figure 15 : Perméabilité d'une double couche lipidique synthétique

(http://www.ulyse.u-bordeaux.fr/atelier/ikramer/biocell_diffusion/gbb.cel.fa.101.b3/index.htm)

Si les ions et la plupart des molécules polaires ne diffusent pas à travers une bicouche lipidique, bon nombre d'entre eux sont capables de traverser les membranes grâce à des transporteurs, protéines intrinsèques particulières. Ceux-ci fixent la sélectivité de chaque type de membrane et jouent un rôle clé dans le fonctionnement d'une membrane. Ces transporteurs se composent de plusieurs régions transmembranaires, formant un tunnel au sein de la bicouche lipidique, permettant aux molécules polaires ou chargées de franchir la membrane

sans entrer au contact des chaînes d'acides gras hydrophobes des phospholipides membranaires.

Il existe deux grandes classes de transporteurs membranaires. La première est celle des conducteurs protéiques ou conductines. Les conductines à ions, par exemple, sont perméables aux ions minéraux comme Na^+ , K^+ ; Ca^{2+} et Cl^- . Une fois ouverts, ces conducteurs protéiques forment de petits pores que les ions de taille appropriée traversent par diffusion. Ces pores s'ouvrent et se ferment sélectivement, en réponse à des signaux extracellulaires, de sorte que la cellule peut ajuster le déplacement des ions à travers sa membrane (Cooper, 1999).

La deuxième classe de transporteurs comprend les perméases protéiques, qui fixent sélectivement et transportent des molécules. Au lieu de former des pores ouverts, ces protéines agissent à la façon d'enzymes pour faciliter le passage des molécules à travers la membrane. En fait, elles capturent un type de molécules particulier, puis changent de conformation pour ménager un pore par lequel la molécule est déchargée sur l'autre face de la membrane (Cooper, 1999).

CHAPITRE 2 : EFFET DE L'ETHANOL SUR LA MEMBRANE PLASMIQUE DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

L'éthanol, à des concentrations élevées, agit comme un stress chimique puissant qui peut inhiber la fermentation, la croissance et entraîner la mortalité cellulaire. L'éthanol provoque une perturbation des structures membranaires et des systèmes de transport. Il induit des altérations de la composition lipidique conduisant à une augmentation de fluidité et de perméabilité de la membrane (Sajbidor, 1997). Il y a une perte associée de potentiel de membrane (Juroszek *et al.*, 1987), une fuite des acides aminés et des composés cellulaires (Salgueiro, 1988).

2.1. Effet de l'éthanol sur la fonction de la membrane

2.1.1. Effet de l'éthanol sur la composition de la membrane

L'éthanol affecte les lipides, les protéines hydrophobes de la membrane mitochondriale, la membrane nucléaire, la membrane vacuolaire et le réticulum endoplasmique. L'éthanol exerce ses effets toxiques principalement sur les membranes cellulaires de la levure, dont les changements en présence d'éthanol ont été largement étudiés. Il est bien établi que la composition des phospholipides et des stérols des membranes cellulaires influence la tolérance à l'éthanol. L'exposition à l'éthanol conduit à l'augmentation de la longueur de l'acide gras et à une proportion accrue d'acides gras insaturés et de stérols dans la membrane cellulaire (D'Amore *et al.*, 1990 ; Mishra, 1993 ; Rose, 1993 ; Sajbidor, 1997).

En aérobie et en anaérobie, l'exposition de cellules de levure à l'éthanol, n'entraîne pas le même taux d'acides gras d'insaturé/saturé. En fait, chez *S. cerevisiae* NCYC 431 cultivée en anaérobie et en présence de 3,5 à 9,0 % (v/v) d'éthanol, Beaven *et al.*, (1982) ont démontré que les proportions d'acides gras mono-insaturés sont accrues, en particulier pour les résidus de C18:1 (acide oléique), tandis que la proportion d'acides gras saturés est réduite, par rapport aux cultures sans éthanol. De même, Sajbidor et Grego (1992) ont observé une augmentation de la proportion de résidus de C18:1 par rapport au C16:1 dans des cultures anaérobies chez *S. cerevisiae* CCY supplémentées jusqu'à 15% (v/v) d'éthanol. Il semble que ce soit en grande partie dû à une diminution du niveau de C16:1 dans toutes les phospholipides analysés (phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine et phosphatidylinositol).

Dans des conditions aérobies, en présence de 10% (v/v) d'éthanol, les lipides membranaires de la souche *S. cerevisiae* 3079 ont également tendance à augmenter pour l'acide oléique (C18:1) et à diminuer pour l'acide palmitique (C16:0) et ne pas changer pour l'acide palmitoléique (C16:1). En plus de l'augmentation de l'insaturation des acides gras, les stérols sont également modifiés vers une plus grande insaturation en faveur de l'ergostérol (Alexandre *et al.*, 1993). Les enzymes impliquées dans la synthèse des stérols, en particulier lors de la conversion du squalène en ergostérol, nécessitent de l'oxygène (Paltauf *et al.*, 1992).

L'absorption d'éléments nutritifs, en présence d'éthanol, est également influencée par la composition lipidique de la membrane. Les travaux de Thomas et Rose (1979) et de Rose et Harrison (1993) rapportent que le taux d'accumulation dans les cellules de solutés tels que le glucose, la glucosamine, la lysine et l'arginine, est réduit après addition d'éthanol. La capacité d'absorption de solutés dans les cellules dont les membranes sont riches en acides gras poly-insaturés augmente par rapport aux cellules dont les membranes contiennent des acides gras mono-insaturés, ceci en relation avec une augmentation de la fluidité membranaire.

2.1.2. Effets de l'éthanol sur les transporteurs membranaires

L'éthanol peut avoir un effet inhibiteur sur les transporteurs membranaires du glucose (Leao et Van Uden, 1982), du maltose (Loureiro-Dias et Peinado, 1982) et de l'ammonium (Leao et Van Uden, 1983) chez *S. cerevisiae*. Ces effets inhibiteurs sont attribués à l'interaction entre l'éthanol et les systèmes de transport à l'intérieur des régions hydrophobes de la membrane plasmique (Leao et Van Uden, 1982 ; Loureiro-Dias et Peinado, 1982). D'autre part, l'éthanol est un inhibiteur non-compétitif des transporteurs de la glycine, de l'alanine, de la phénylalanine, de la tyrosine et du tryptophane. Cependant, le transport des acides aminés est affecté pour des niveaux d'éthanol élevés (Leao et Van Uden, 1984).

2.2. Effet de l'éthanol sur la fluidité de la membrane

D'après Jones et Greenfield (1987), la fluidité de la membrane plasmique augmente exponentiellement (mesurée par la perméabilité passive à l'acide acétique) avec la concentration en éthanol, corrélée à la perméabilité de la membrane. Cependant, les

membranes des cellules en contact avec 6,5% (v/v) d'éthanol lors d'une culture en continu puis exposées à des concentrations plus élevées d'éthanol, sont moins fluides, donc moins perméables, suggérant l'induction d'une réponse adaptative des cellules au cours de la culture.

L'effet direct de l'éthanol à 7-10% (v/v) sur la fluidité de la membrane a également été étudié en utilisant la spectroscopie de résonance de spin électronique (ESR). La fluidité membranaire augmente dans des fractions microsomales incubées à 9% (v/v) d'éthanol (Lloyd *et al.*, 1993). Swan et Watson (1997) ont constaté que la fluidité de la membrane augmente légèrement dans toutes les souches levuriennes testées après un traitement pendant 60 minutes à 17% d'éthanol. L'augmentation observée est accompagnée d'une légère augmentation de la survie des cellules. D'après Alexandre *et al.* (1994), l'augmentation de la fluidité de la membrane chez *S. cerevisiae* adaptée à l'éthanol est corrélée à une diminution des taux de stérols/phospholipides et de stérols/protéines, et à une augmentation de l'indice d'insaturation. Cependant, les travaux de Gille *et al.* (1993) indiquent que la fluidification des membranes plasmiques de *S. cerevisiae* et de *Schizosaccharomyces pombe* a lieu au cours de la simple aération de la culture cellulaire en l'absence de substrats. Dans ces conditions, elle n'augmente que légèrement en présence d'éthanol à 200 mM.

2.3. Relations entre le stress éthanol et le stress oxydatif

Les organismes aérobies doivent maintenir un équilibre redox cellulaire lorsqu'ils font face à des conditions oxydantes. Le stress oxydatif est induit chez les organismes aérobies par la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui provoquent des lésions de l'ADN, la peroxydation des lipides et des dommages aux protéines, aux glucides et à d'autres composants cellulaires. L'anion superoxyde (O_2^-), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), et le radical hydroxyle (OH) sont les ROS les plus importantes produites par les cellules. Ces ROS sont fréquemment formées à partir des métabolites cellulaires issus de la respiration et de la β -oxydation des acides gras. Elles sont également produites par les cellules de levure exposées à l'éthanol (Costa *et al.*, 1993 ; Jamieson, 1998 ; Georgiou et Masip, 2003 ; Halliwell, 2007). Les cellules de levure développent des réponses adaptées pour neutraliser les ROS et se protéger des dommages oxydatifs (Jamieson, 1998).

Un certain nombre d'enzymes peuvent effectivement inactiver les ROS. Il s'agit principalement de la superoxyde dismutase cytoplasmique (CuZnSOD, codée par le gène *SOD1*), la superoxyde dismutase mitochondriale (MnSOD, codée par le gène *SOD2*), l'alkyl hydroperoxyde reductase (codée par le gène *AHP1*), la cytochrome c peroxydase (CCP), et la catalase cytoplasmique T (codée par le gène *CTT1*) (Schüller *et al.*, 1994, Costa *et al.*, 1996 ; Jeong *et al.*, 1999 ; Alexandre *et al.*, 2001 ; Stanley *et al.*, 2010b ; Morano *et al.*, 2012). Pereira *et al.* (2003), en utilisant des souches de *S. cerevisiae* contenant des délétions spécifiques Δsod , ont vérifié que les isoformes *Sod1p* jouent des rôles différents dans le processus d'acquisition de la tolérance à des stress oxydatifs. En fait, MnSOD est impliquée dans l'acquisition de la tolérance au stress éthanol et au stress thermique, tandis que le déficit en CuZnSOD est jugé bénéfique pour la protection contre le stress éthanol et le stress thermique. Les auteurs suggèrent que MnSOD pourrait empêcher la réaction de niveaux élevés de O_2^- , qui se produit au cours du stress éthanol, avec des biomolécules à l'intérieur des mitochondries. Cela permettrait également de prévenir la diffusion de O_2^- dans le cytosol en protégeant les lipides et les protéines contre les dommages oxydatifs (Costa *et al.*, 1993 ; Moradas-Ferreira *et al.*, 1996 ; Pereira *et al.*, 2003).

Gille *et al.* (1993) ont constaté que l'activité des catalases intracellulaires de *S. cerevisiae* augmente lorsque les cellules sont en présence d' O_2 sans substrat. Le même phénomène est observé en présence d'éthanol. Cependant, la catalase est inhibée sous aération, en présence de glucose. L'activité de la catalase liée à la membrane augmente chez les cellules aérées. De plus, chez la levure *Schizosaccharomyces pombe*, l'activité de cette enzyme est stimulée par l'éthanol.

D'autres études ont également montré l'augmentation de l'activité du cytochrome P450 lorsque les levures sont exposées à l'éthanol. Le cytochrome P450, codé par *ERG11*, est impliqué dans l'oxydation de substrats endogènes et exogènes. Il est impliqué dans la synthèse de l'ergostérol du réticulum endoplasmique et est capable de détoxifier les produits formés par l'oxydation due à des produits chimiques tels que l'éthanol (Mishra, 1993 ; Piper, 1995).

L'éthanol peut interférer dans le mécanisme de protection des cellules levuriennes par les antioxydants. La catalase, par exemple, est incapable de contrer les effets toxiques de

l'éthanol. L'éthanol provoque la peroxydation lipidique, ce qui conduit à la diminution de l'ordre membranaire. Il interfère sur la capacité de défense de la catalase, conduisant à une dégradation de l'intégrité de la membrane et à la perte de sa perméabilité.

CHAPITRE 3 : REPONSE AU STRESS ETHANOL CHEZ SACCHAROMYCES CEREVISIAE

Les effets de l'éthanol sur la cellule sont multiples et la réponse de *S. cerevisiae* est aussi complexe. Elle peut être affectée à la présence de l'ergostérol dans les membranes cellulaires, à la morphologie vacuolaire et l'expression de gènes. Ce qui suit décrit les principales modifications cellulaires qui se produisent en réponse à la toxicité de l'éthanol.

3.1. Teneur en ergostérol dans la membrane plasmique et tolérance à l'éthanol chez *S. cerevisiae*

L'augmentation de la teneur en ergostérol dans la membrane plasmique a été corrélée positivement à l'augmentation de la tolérance à l'éthanol (Thomas *et al.*, 1978 ; Del Castillo Agudo, 1992 ; Alexandre *et al.*, 1994 ; Alexandre *et al.*, 1996 ; Swan & Watson, 1998 ; Aguilera *et al.*, 2006). L'addition de l'ergostérol dans le milieu de fermentation semble améliorer la viabilité des cellules et le taux de croissance dans des conditions de stress éthanol (Swan & Watson, 1998 ; Tran *et al.*, 2010). L'ergostérol est lié à la stabilité de la membrane en conditions de pression hypertonique, ce qui peut expliquer la survie accrue observée quand l'ergostérol est ajouté dans le milieu (Hossack & Rose, 1976). L'ergostérol interviendrait également contre l'instabilité de la membrane causée par la production d'éthanol en cours de fermentation.

3.1.1. L'ergostérol atténue l'inter-digitation des groupes d'acides gras membranaires en conditions de stress éthanol

Comme présenté précédemment, l'éthanol influence la structure de la membrane cellulaire et l'inter-digitation de la bicouche phospholipidique. Tierney *et al.* (2005) ont montré que, en présence d'éthanol, les bicouches composées de 1,2-dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) ont tendance à s'interdigiter, déstabilisant ainsi la structure membranaire en deux feuillets. En présence d'ergostérol dans des vésicules de DPPC, l'interdigitation est retardée. Des concentrations en éthanol d'environ 7% sont nécessaires pour induire une inter-digitation dans

des vésicules de DPPC contenant 20 à 25% d'ergostérol par rapport à des vésicules de DPPC purs. Pour des concentrations plus faibles en ergostérol (10 à 15% mol), l'interdigitation est aussi retardée, mais pour des concentrations en éthanol inférieures à 5%. Ce résultat montre que l'ergostérol améliore la capacité de résistance de la structure membranaire exposée à de fortes concentrations en éthanol. Cependant, le mécanisme par lequel l'ergostérol retarde l'interdigitation de modèles membranaires reste inconnu et l'implication biologique de ce processus n'a pas été étudiée.

3.1.2. L'ergostérol diminue la perméabilité de la membrane en conditions de stress éthanol

Dickey *et al.* (2009) ont montré que l'augmentation de la teneur en ergostérol de vésicules de DPPC dans des conditions de stress éthanol est corrélée à une diminution de la perméabilité membranaire. Les mêmes auteurs ont observé que la perméabilité des vésicules de DPPC est plus faible pour de faibles concentrations en ergostérol membranaire. Cependant, à des concentrations plus élevées en éthanol (à partir de 15% v/v), le rôle positif de l'ergostérol sur l'augmentation de la perméabilité de la membrane décroît. Sur ce plan aussi l'implication du phénomène dans des membranes biologiques reste à étudier.

3.1.3. Impact de l'expression des gènes de biosynthèse de l'ergostérol sur les niveaux de tolérance à l'éthanol

La présence de l'ergostérol a un impact positif sur la croissance cellulaire en conditions de stress éthanol. Les données de Shobayashi *et al.* (2007) ont montré que les souches de *S. cerevisiae* testées, présentant une tolérance plus élevée à l'éthanol, avaient également augmenté l'expression de gènes associés à la biosynthèse d'ergostérol.

Comme vu précédemment, plusieurs gènes sont impliqués dans la biosynthèse de l'ergostérol. *ERG6* est le gène codant pour la delta (24) -stérol C-méthyltransférase. Inoue *et al.* (2000) ont construit des mutants sensibles à l'éthanol à partir d'une souche de *S. cerevisiae* du saké en utilisant le methane-sulfonate d'éthyle (EMS). Certaines souches sensibles à l'éthanol ont été isolées. La souche *es5* a été choisie pour la poursuite des travaux. Les auteurs ont exprimé le gène *ERG6* dans cette souche mutante et ont constaté qu'elle récupère des niveaux de tolérance à l'éthanol similaires à ceux de la souche parentale.

Shobyashi *et al.* (2005) ont comparé la teneur en ergostérol et la tolérance à l'éthanol d'une souche de *S. cerevisiae* isolée du saké (K9) avec une souche de laboratoire (X2180), non-tolérante à l'éthanol, au cours d'une fermentation. Pendant l'exposition à l'éthanol, K9 s'est révélée avoir une teneur en ergostérol plus élevée. Les auteurs ont également constaté que l'expression de gènes associés à la biosynthèse d'ergostérol de K9 était plus élevée que chez la souche X2180. L'augmentation des niveaux d'expression des gènes impliqués dans la synthèse d'ergostérol permettent à la souche K9 de produire des concentrations en ergostérol plus élevées, corrélés à des niveaux de tolérance à l'éthanol plus élevées. Similairement, Stanley (2010b) a effectué des études de transcriptomique par micro-array comparant la tolérance à l'éthanol d'un mutant avec sa souche parentale en conditions de stress éthanol. De nombreux gènes impliqués dans la biosynthèse de l'ergostérol sont surexprimés chez la souche parentale.

En résumé, l'ergostérol s'oppose à certains des effets destructurants et toxiques de l'éthanol en augmentant la stabilité de la membrane et peut-être en prévenant l'interdigitation. Pour les souches présentant des tolérances élevées à l'éthanol, l'expression de gènes impliqués dans la voie de biosynthèse de l'ergostérol est augmentée, permettant la production de membranes avec une teneur en ergostérol plus forte. Ces observations peuvent expliquer pourquoi la supplémentation en ergostérol dans un milieu de croissance augmente la capacité des cellules à tolérer des concentrations en éthanol plus élevées (Tran *et al.*, 2010).

3.2. Rôle de la vacuole dans la réponse au stress éthanol

Le stress éthanol induit des changements dans la morphologie vacuolaire, notamment par un élargissement de son diamètre (Fig. 16). Le fait qu'un élargissement de la vacuole soit associé à la tolérance à l'éthanol est toutefois incertain (Maeden *et al.*, 1999 ; Izawa *et al.*, 2005 ; Matsuura & Takagi, 2005 ; Pratt *et al.*, 2007 ; Abe *et al.*, 2009).

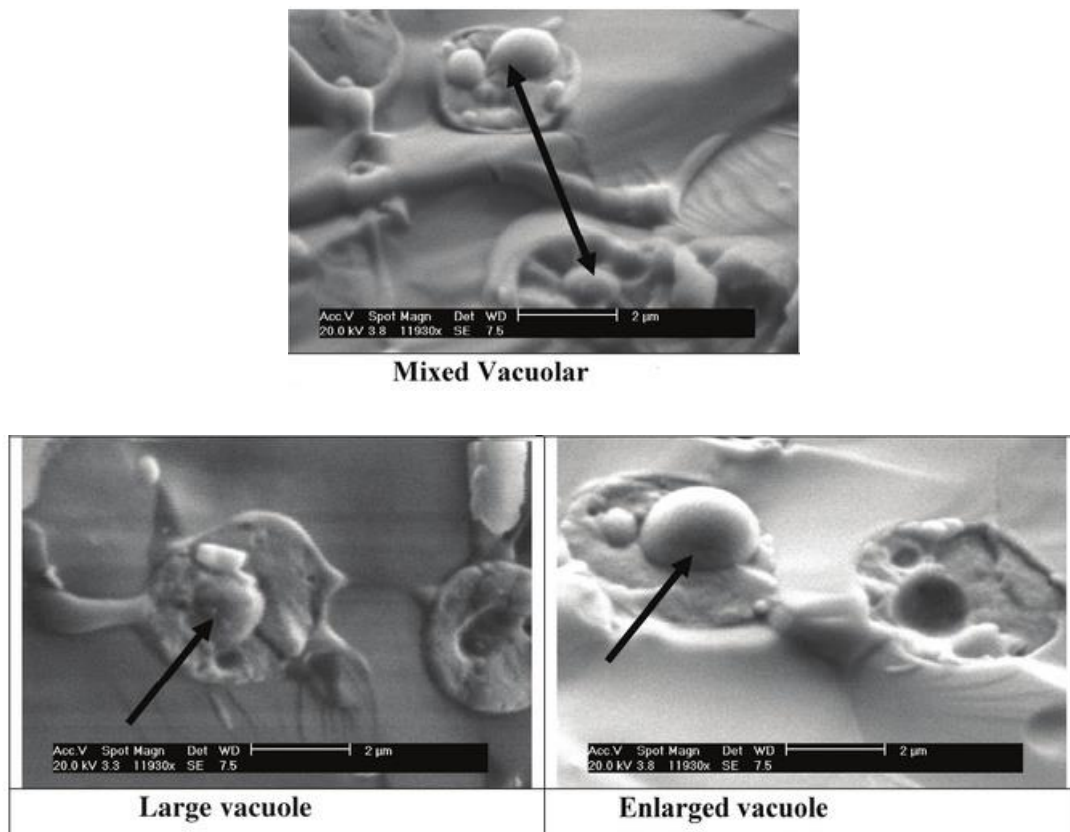


Figure 16 : Changements typiques associés au diamètre vacuolaire de *Saccharomyces cerevisiae* soumise au stress éthanol; (A) : vacuolaire mixte ; (B) : grande vacuole ; (C) : vacuole agrandie
(Pratt *et al.*, 2007)

Les gènes codant pour des composants de la vacuole tels que l' H^+ -ATPase, *VMA2*, *VMA6*, *VMA8*, *VMA10*, et *VMA21* sont essentiels en conditions de stress éthanol (Kubota *et al.*, 2004; Fujita *et al.*, 2006 ; Auesukaree *et al.*, 2009 ; Ma & Liu, 2010a ; Ma & Liu, 2010b). Le stress éthanol altère l' H^+ -ATPase localisée au niveau de la membrane plasmique. Il est possible que la cellule essaie de contrôler le pH intracellulaire à l'aide de l' H^+ -ATPase vacuolaire, pour contrecarrer l'acidification intracellulaire provoquée par le stress éthanol (Carmelo & Bogaerts, 1996).

3.3. Expression globale des gènes en réponse au stress éthanol

La disponibilité de la séquence du génome de *S. cerevisiae* a conduit au développement de micro-arrays. Dans une étude d'Alexandre *et al.* (2001), les cellules de *S. cerevisiae* S288C ont été cultivées dans un milieu riche à 30°C en présence et en absence de 7% (v/v) d'éthanol. Le niveau d'expression globale de gènes a été déterminé au bout de 30 minutes. Le stress

éthanol a modifié les niveaux d'expression de 395 ORFs (Open Reading Frames). Parmi eux, 194 ont été surexprimés et 201 ont été sous-exprimés. Chandler *et al.* (2004) et Stanley *et al.* (2010b) ont incrémenté les résultats d'Alexandre *et al.* (2001), en utilisant *S. cerevisiae* PMY1.1. Ces auteurs ont montré que *S. cerevisiae* a probablement des réponses générales aux stress telles que celles régies par STREs (Stress response elements), qui sont trouvés dans les promoteurs de nombreux gènes (Ruis & Schüller, 1995 ; Gasch *et al.*, 2000). La réponse générale au stress est induite par de nombreux facteurs et n'est pas spécifique à l'éthanol. En fait, la comparaison de l'expression génétique de souches sauvages sensibles à l'éthanol à celle de souches mutantes tolérantes à l'éthanol (tels que *kt1*, *sr43*, *ets1-5*, *VSPs*, *SLTs*,...) a montré le rôle dans la tolérance au stress éthanol de plusieurs gènes habituellement exprimés lors des stress thermiques, osmotiques ou oxydatifs (Ogawa *et al.*, 2000 ; Takahashi *et al.*, 2001 ; Van Voorst *et al.*, 2006).

Certains gènes sont régulièrement identifiés et voient leur expression augmenter lors de l'exposition des cellules de levures au stress éthanol. Les gènes codant pour les protéines de choc thermique (HSP), comme *Hsp12*, *Hsp26* et *Hsp104*, font partie des gènes les plus surexprimés en présence d'éthanol (Sanchez *et al.*, 1992 ; Piper, 1995, Piper *et al.*, 1994; 1997 ; Ogawa *et al.*, 2000 ; Sales *et al.*, 2000 ; Jiménez *et al.*, 2009). Par exemple, Sales *et al.* (2000) ont démontré que la surexpression de *Hsp12* réduit la fluidité membranaire causée par l'éthanol. Jiménez *et al.* (2009) ont montré que l'augmentation de l'expression de *Hsp26* dans des souches de levures isolées de vins est également associée à l'exposition accrue des souches à l'éthanol, ainsi qu'à l'amélioration des capacités de fermentation des levures. Sanchez *et al.* (1992) ont démontré qu'une interruption du gène *Hsp104* chez une souche de *S. cerevisiae* de laboratoire diminue les niveaux de tolérance à l'éthanol de cette souche. Il est intéressant de souligner qu'aucun des gènes *HSP* n'a été identifié dans le crible des gènes fonctionnels comme requis pour la croissance en conditions de stress éthanol.

Une mutation dans le gène *ERG6* rend les mutants plus sensibles (Inoue *et al.*, 2000) et la sur-expression de *OLE1*, qui code pour une D-9-désaturase d'acides gras, diminue la sensibilité de la souche (Kajiwarra *et al.*, 2000). La présence de stérols et d'acides gras insaturés dans les membranes est déjà connue pour avoir une importance dans la tolérance à l'éthanol.

Les gènes de réponse à l'hyper-osmolarité, *Hor2*, *Hor7* (codant pour la hyperosmolarity-responsive protéine), sont également surexprimés au cours du stress éthanol dans les travaux

d'Alexandre *et al.* (2001). De plus, un gène codant pour une enzyme impliquée lors des stress oxydatif (*CTT1*) est également surexprimé (Ogawa *et al.*, 2000).

Nous avons synthétisé les gènes impliqués dans la résistance à l'éthanol dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Synthèse présentant l'expression globale des gènes identifiés dans la résistance à l'éthanol.

GENE	Takahashi <i>et al.</i> (2001)	Alexandre <i>et al.</i> (2001)	Fujita <i>et al.</i> (2006)	Chandler <i>et al.</i> (2004)	Ogawa <i>et al.</i> (2000)	Van Voorst <i>et al.</i> (2006)	Stanley <i>et al.</i> (2010b)	Auesukaree <i>et al.</i> (2009)	Jiménez <i>et al.</i> (2009)	Lam <i>et al.</i> (2014)	Total
<i>ACT1</i>					1						1
<i>AHP1</i>		1					1				2
<i>ALD4</i>		1		1			1				3
<i>ATP1</i>						1		1			2
<i>BUB1</i>			1					1			2
<i>BUD27</i>			1					1			2
<i>CIT1</i>		1	1								2
<i>CIT2</i>		1		1							2
<i>CTT1</i>		1	1	1			1				4
<i>DAK1</i>		1	1	1							3
<i>DDR2</i>		1		1							2
<i>ETSs</i>	1										1
<i>GLC3</i>		1	1								2
<i>GLK1</i>		1	1	1							3
<i>GMP2</i>		1	1								2
<i>GPD1</i>		1			1						2
<i>GPH1</i>		1	1								2
<i>GRX1</i>		1		1							2
<i>GSY2</i>			1	1							2
<i>HOR7</i>		1	1	1	1		1				5
<i>HSP104</i>		1	1	1	1		1				5
<i>HSP12</i>		1	1	1	1		1				5
<i>HSP26</i>		1	1	1			1		1		5
<i>HSP30</i>		1	1	1							3
<i>HSP42</i>		1		1							2
<i>HSP78</i>		1	1	1							3
<i>MCR1</i>		1		1							2
<i>OPI3</i>				1			1				2
<i>PGKs</i>			1	1			1				3
<i>PMA1</i>										1	1
<i>PYC1</i>		1		1							2
<i>SODs</i>		1					1				2
<i>SSA3</i>		1									1
<i>SSA4</i>		1	1								2
<i>SSE2</i>		1	1	1							3
<i>TDH1</i>		1	1	1			1				4
<i>TPS1</i>				1	1						2
<i>TPS2</i>				1	1						2
<i>TRK1</i>										1	1
<i>TRX3</i>			1		1						2
<i>TSL1</i>		1		1							2
<i>VPS34</i>	1					1					2

CHAPITRE 4 : METHODES DE MESURE DE L'ETAT PHYSIQUE DES LIPIDES MEMBRANAIRES EN CONDITION DE STRESS ETHANOL

Dans ce chapitre, nous nous intéressons aux techniques qui peuvent être employées pour évaluer l'état des lipides membranaires au cours de modifications engendrées par la présence d'éthanol. Dans un premier temps, les principales techniques d'étude de l'état des lipides membranaires sont répertoriées. Ces techniques permettent de mesurer les transitions de phases membranaires directement par la détection de la conformation des chaînes hydrocarbonées des lipides ou indirectement par la mesure de la fluidité membranaire. En fonction de la technique, il est possible d'étudier des modèles membranaires, des membranes isolées, des extraits lipidiques de cellules ou des cellules entières. Puis nous nous intéressons particulièrement à la technique de spectroscopie de fluorescence.

4.1. Techniques d'étude de la structure des membranes

Le comportement des membranes biologiques peut être étudié indirectement par l'emploi de modèles lipidiques simples constitués de plusieurs lipides différents ou de modèles lipidiques complexes constitués d'extraits lipidiques issus de cellules. Certaines techniques sont disponibles pour étudier des membranes biologiques isolées sur des cellules vivantes. Les lipides participent de manière importante à la structuration des membranes. Donc l'étude de systèmes modèles lipidiques permet d'améliorer les connaissances sur la structure des membranes. Les modèles lipidiques sont des bicouches lipidiques planes, le plus souvent multi-lamellaires, ou des liposomes. Les liposomes sont les modèles lipidiques les plus utilisés. Ce sont des vésicules dont la surface est constituée d'une bicouche lipidique et qui renferment un volume de solvant aqueux dans lequel ils ont été préparés. Les liposomes géants uni-lamellaires constituent un modèle membranaire très utilisé (Akashi *et al.*, 1996 ; Bagatolli & Gratton, 1999). Les modèles membranaires sont utilisés pour étudier les modifications de phases en fonction des paramètres environnementaux et les interactions lipides/protéines (Gennis, 1989 ; Shechter, 2004).

Les principales techniques d'étude de l'état des membranes sont répertoriées dans le Tableau 3. Les types de préparations étudiées sont précisés pour chaque technique.

Tableau 3 : Différentes méthodes de mesure des propriétés physiques de la membrane

Méthode	Principe	Echantillons étudiés	Références
Diffraction au rayonnement X	Mesurer des réflexions distinctes et la distribution de densité des électrons dans un échantillon pour fournir des évaluations quantitatives de la fraction des chaînes hydrocarbonées dans les conformations ordonnées ou désordonnées et pour analyser des structure ordonnées.	Extraits lipidiques de membranes Membranes	Gennis, 1989 ; Shechter, 2004 ; Morein <i>et al.</i> , 1996
Calorimétrie différentielle à balayage (DSC- Differential scanning calorimetry)	Obtenir les informations sur la thermodynamique des membranes modèles ou des biomembranes. Mesurer et caractériser les changements de l'état physique des lipides polymorphiques mais aussi caractériser les perturbations des lipides purs par des interactions avec d'autres matériels tels que d'autres lipides, des protéines, des ions ou des petites molécules hydrophobes....	Double couche lipidique Extraits lipidiques de cellules	Gennis, 1989 ; Huang & Li, 1999 ; Goni & Alonso, 2000
Spectroscopie RMN(résonance magnétique nucléaire)	Mesurer la résonance magnétique des noyaux atomiques dont le spin n'est pas nul tels que l'atome d'hydrogène. La forme du spectre renseigne sur l'ordre de la phase lipidique.	Double couche lipidique de composition binaire Extraits lipidiques de membranes	Hsueh <i>et al.</i> , 2005 ; Goni & Alonso, 2000 ; Morein <i>et al.</i> , 1996
Spectroscopie Infra Rouge (FTIR)	Mesurer l'énergie absorbée par les atomes pour vibrer lorsqu'ils sont excités par des radiations infrarouges. La fréquence de vibration est spécifique d'une fonction chimique et de sa mobilité.	Double couche lipidique Membranes isolées Cellules entières	Aguedo <i>et al.</i> , 2002 ; Gattoni, 2003
Résonance paramagnétique Electronique (ESR-Electron Spin Résonance)	Mesurer la résonance paramagnétique électronique de sondes paramagnétiques insérées dans la membrane. La forme du spectre dépend de la mobilité de la sonde.	Liposomes Cellules entières	Glover <i>et al.</i> , 1999 ; Goni & Alonso, 2000

Les types d'échantillons étudiés par les différentes techniques sont principalement des dispersions aqueuses de lipides sous forme de couches multi-lamellaires de composition simple. En effet, l'étude de modèles membranaires complexes composés de plusieurs lipides ou d'extraits lipidiques biologiques est difficile à cause du recouvrement des spectres des différents constituants (Bottema *et al.*, 1983). Cet inconvénient peut être paré par l'utilisation d'une sonde membranaire, comme par exemple l'insertion d'un lipide deutéré en spectroscopie infrarouge (Veiga *et al.*, 1999) ou d'une sonde paramagnétique en résonance para-magnétique électronique. Ceci augmente considérablement le coût des expériences et l'insertion de la sonde est souvent complexe. De plus, très peu de techniques permettent de travailler sur des cellules entières et donc d'étudier l'évolution de la fluidité membranaire. Le comportement d'isolats ou d'extraits membranaires ne reflète en effet pas forcément la réalité d'une membrane biologique dans une cellule vivante (Laroche *et al.*, 2005).

Une autre technique permet d'étudier les membranes biologiques complexes par l'utilisation de sondes membranaires spécifiques, c'est la spectroscopie de fluorescence. C'est une technique très sensible qui apporte plus d'informations que la calorimétrie différentielle à balayage (Bottema *et al.*, 1983) et est plus facile à utiliser que la résonance para-magnétique électronique (Borenstain et Barenholz, 1993).

4.2. Sondes de fluorescence

L'étude de la fluorescence de sondes membranaires spécifiques offre de larges possibilités pour l'étude structurale des membranes biologiques. L'utilisation de sondes spécifiques permet d'évaluer l'état des membranes ou de les visualiser.

Dans le cadre de ce travail, les techniques de fluorescence sont donc adaptées pour suivre l'évolution de l'état des lipides membranaires sur des cellules entières et au cours de variations des paramètres environnementaux (stress éthanol).

La polarisation de fluorescence est une technique très sensible. Les sondes fluorescentes utilisées dans la polarisation de fluorescence peuvent se partitionner dans la bicouche lipidique et sont sensibles aux changements de fluidité membranaire résultant des changements structuraux. Lorsque la sonde est insérée dans la bicouche, des interactions avec les lipides membranaires peuvent empêcher les mouvements rotationnels de la sonde et

affecter la dépolarisation de la lumière excitée. Cette dépolarisation est utilisée pour calculer les valeurs de polarisation de fluorescence (Trevors, 2003).

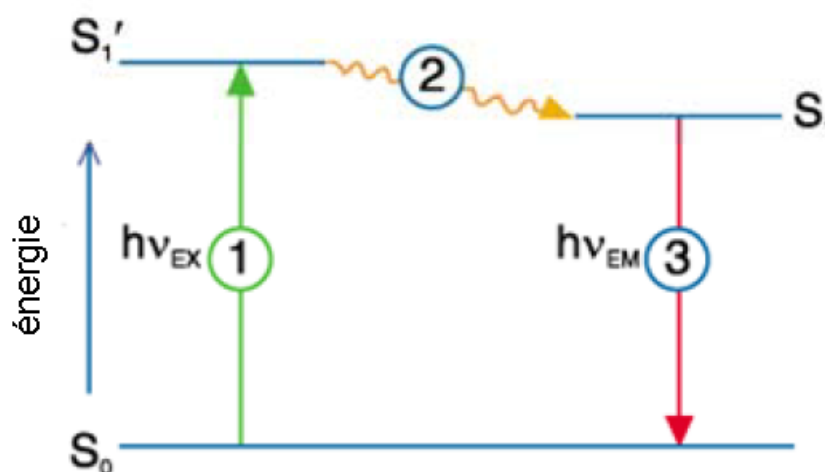


Figure 17 : Représentation schématique du phénomène physique de fluorescence. Un fluorochrome initialement dans un état fondamental S_0 absorbe un photon fourni par une source externe (1) et entre dans un état électroniquement excité ou état singulet S_1' . La durée de vie à l'état excité est limitée et le fluorochrome entre rapidement dans un état singulet relaxé S_1 (2). Dans cet état, le fluorochrome peut restituer l'énergie emmagasinée et retrouver son état fondamental S_0 par émission d'un photon (3).

4.2.1. Le principe de mesure repose sur la fluorescence qui est la ré-radiation de la lumière à une énergie plus faible (longueurs d'onde plus longues que la lumière absorbée) (Fig. 17). Une partie d'énergie est perdue comme chaleur durant la fluorescence. L'intensité de la lumière émise est une fonction linéaire du fluorochrome à une longueur d'onde constante. La lumière polarisée n'excitera que les molécules fluorescentes dont le moment d'absorption est favorablement orienté. La polarisation de la lumière polarisée dépend du degré des mouvements moléculaires durant l'excitation. Une polarisation élevée indique un ordre structural élevé ou une faible fluidité membranaire (Trevors, 2003).

4.2.2. Les avantages de l'utilisation des sondes fluorescentes sont nombreux. Ces sondes peuvent être incorporées dans les cellules intactes sans endommager la membrane cytoplasmique. Elles n'interfèrent pas l'événement mesuré. Les sondes fluorescentes permettent aux membranes cytoplasmiques d'être étudiées dans diverses conditions environnementales de croissance et en présence ou absence de composés toxiques à des

températures variées. Leurs spectres d'absorption et d'émission spécifiques sont facilement détectables. De plus, des faibles signaux peuvent être généralement détectés. Un faible nombre de cellules de micro-organismes est adéquat pour l'analyse. Aucun pré-traitement n'est nécessaire pour incorporer les sondes dans les cellules. Le dernier avantage important est que les sondes sont stables, sensibles et facilement produites. De plus, elles ne présentent qu'un faible danger pour le manipulateur (Trevors, 2003).

4.2.3. L'inconvénient de la polarisation de fluorescence est que la dépolarisation des sondes fluorescentes fournit des données sur le comportement moyen des lipides membranaires. Généralement, les effets localisés sur les lipides membranaires ne sont pas efficacement étudiés par cette technique. Par exemple, quand un composé chimique est préférentiellement concentré dans certaines zones de la membrane, les changements de l'environnement lipidique entourant ce composé ne peuvent pas être détectés si la sonde ne s'insère pas dans ces mêmes zones. La sonde pourrait aussi causer des déviations dans la membrane. Ces perturbations pourraient dépendre de la phase lipidique ou n'affecteraient que certains plans dans la bicouche. Les interférences avec les mesures dues à l'introduction de la sonde ne peuvent être complètement éliminées mais elles peuvent être réduites ou prises en considération (Cronan & Gelmann, 1975 ; Denich *et al.*, 2003).

Quelques restrictions dans l'interprétation quantitative des données reliées aux mouvements des sondes au sein des biomembranes sont mentionnées ci-dessous (Gennis, 1989).

- La bicouche lipidique n'est pas un simple liquide homogène en trois dimensions, mais un fluide mince qui est différent structuralement et dynamiquement dans son centre, comparé aux régions polaires.
- Les sondes utilisées ne tournent pas simplement isotropiquement comme des sphères avec aucun axe préféré de rotation. Les sondes ont souvent des orientations préférées dans la bicouche. L'interprétation des données expérimentales peut dépendre du modèle utilisé pour représenter les mouvements moléculaires.
- Les sondes peuvent résider dans différentes localisations au sein des biomembranes. Par exemple, la sonde pourrait être adjacente à une protéine ou entrappée par des agrégats protéiques, ou dans des domaines lipidiques qui pourraient être dans différents états physiques.

4.2.4. Principales sondes membranaires utilisées en spectroscopie de fluorescence

Les sondes fluorescentes utilisées pour l'étude des membranes sont des sondes qui se localisent spécifiquement dans les doubles couches lipidiques membranaires et sont sensibles aux altérations de la fluidité membranaire dues aux modifications structurales des lipides. De nombreuses sondes fluorescentes peuvent être utilisées suivant leur localisation lors de l'incorporation dans la membrane. La sonde hydrophobe 1,6-diphényl-1,3,5-hexatriène (DPH) et ses analogues : l'acide 3-(4-(6-phényl)-1,2,5-hexatriényl phénylpropionique (DPH-PA) et le 1-[4-(triméthyl-amino)-phényl]-6-phénylhexa-1,3,5-triène (TMA-DPH) sont fréquemment utilisés (Trevors, 2003). Le DPH s'aligne avec les chaînes acylées des phospholipides et est distribué au centre de la bicouche phospholipidique, alors que le DPH-PA s'insère dans les régions externes de la bicouche au niveau des têtes polaires des phospholipides. Ses intégrations dans les membranes influencent légèrement la fluidité membranaire (Repakova *et al.*, 2005), c'est pourquoi la concentration en fluorochrome utilisée doit être minimisée. De plus, un des inconvénients de cette sonde est qu'elle diffuse dans les autres membranes au cours du temps. Le TMA-DPH permet également d'évaluer le taux de flip-flop des lipides de la couche interne à la couche externe de la membrane. L'anisotropie de fluorescence des sondes fournit des données sur le comportement moyen des lipides membranaires suivant les mouvements de rotation de la sonde dans la bicouche membranaire.

D'autres sondes fluorescentes peuvent être utilisées comme le 2-diméthylamino-6-lauroylnaphtalène (Laurdan) et le 2-diméthylamino-6-propionylnaphtalène (Prodan). Le Laurdan, qui a une structure proche d'un phospholipide, s'intercale le long des chaînes d'acides gras des phospholipides, alors que le Prodan, molécule plus courte, interagit au niveau du « squelette » glycérol près de l'interface aqueuse. Les longueurs d'onde d'émission maximales de ces deux sondes dépendent de l'état de phase des phospholipides dans la bicouche (Parasassi *et al.*, 1998). Ces sondes permettent de rendre compte du degré d'hydratation et de la mobilité de l'eau dans la membrane. L'émission bleue (environ 440 nm) correspond à un phospholipide à l'état gel et la verte (environ 490 nm) à un phospholipide à l'état liquide cristallin. Les variations du contenu en eau des membranes provoquent des transitions dans le spectre d'émission du Laurdan qui sont quantifiées par le calcul de la polarisation généralisée (GP).

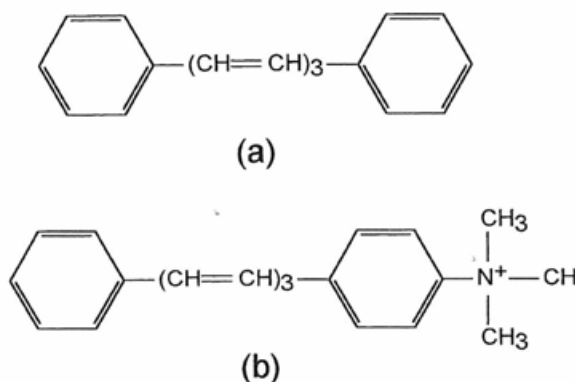


Figure 18 : Formules chimiques du DPH (a) et du TMA-DPH (b)

Le DPH est une des sondes membranaires les plus utilisées pour étudier les membranes biologiques et pour estimer de façon macroscopique la rigidité de la membrane (Fig. 18). Cependant, selon l'étude d'Abe & Hiraki (2009), le DPH peut former des granules localisés principalement dans le cytoplasme chez une souche sauvage de levure et les mutants *Δerg* de *S. cerevisiae*, alors qu'une localisation membranaire de la sonde est attendue. En revanche, le TMA-DPH (Fig. 18) se localise clairement dans la membrane plasmique de la cellule et présente une distribution uniforme à travers la membrane plasmique. Par conséquent, le TMA-DPH est aujourd'hui préconisé pour les mesures d'anisotropie de fluorescence. Nous avons utilisé cette sonde pour ce travail.

CONCLUSION DE L'ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE ET PRESENTATION DES OBJECTIFS DE LA THESE

Le stress éthanol induit une réponse adaptative chez la levure. Cette réponse est une reprogrammation des activités cellulaires pour assurer la survie, protéger les composants cellulaires essentiels et permettre une reprise de l'activité cellulaire pendant la période de récupération. Les concentrations en éthanol élevées agissent comme un stress chimique fort, inhibant la fermentation, l'activité métabolique, la croissance et induisant une mortalité cellulaire. L'effet prédominant de l'exposition de l'éthanol sur les cellules de levure est la perturbation de la structure et de la fonction membranaires. L'éthanol provoque des changements dans la composition lipidique de la membrane plasmique, ce qui peut induire une diminution de l'intégrité fonctionnelle de la membrane. L'éthanol affecte également les protéines hydrophobes des membranes mitochondriale, nucléaire, vacuolaire et du réticulum endoplasmique. Cependant, le mécanisme des effets de l'éthanol sur la levure est complexe et n'a pas encore été totalement élucidé.

Les stérols représentent une fraction importante des lipides membranaires et sont décrits comme des composants importants pour la stabilité de la membrane plasmique. En effet, outre leurs rôles dans des phénomènes physiologiques tel que l'endocytose, ils sont capables de tamponner les transitions structurales des bicouches lipidiques. Ils sont notamment impliqués dans la résistance des cellules à des perturbations physiques, comme la température, ou des perturbations chimiques (H_2O_2 , cycloheximide). Ces molécules pourraient donc jouer un rôle important dans la résistance des cellules aux fluctuations éthanoliques puisque ces perturbations sont connues pour déstabiliser la membrane plasmique. De plus, ces molécules ont également été décrites comme pouvant diminuer l'oxydation des lipides. Cette protection contre l'oxydation dépend de la structure chimique des stérols. Ainsi, certains stérols pourraient également influencer la survie cellulaire lors de réalisations de stress éthanol où l'oxygène de l'air entre en contact direct avec les cellules.

Dans ce travail de thèse, nous avons cherché à comprendre les mécanismes impliqués dans la survie ou la mort de la levure *Saccharomyces cerevisiae* lors d'un stress éthanol. La compréhension des modifications touchant la membrane plasmique est ainsi particulièrement importante pour optimiser la survie cellulaire. Un intérêt particulier a également été porté sur

l'effet de stérols membranaires dans la résistance des levures à des concentrations en éthanol élevées.

Les objectifs de ce travail de thèse visent donc la compréhension des mécanismes membranaires de déstabilisation ou de résistance (phénomènes biologiques et biophysiques) chez les micro-organismes soumis à un stress éthanolique. Nous nous sommes intéressés plus particulièrement au rôle de l'ergostérol chez la levure *S. cerevisiae* dans sa résistance au stress éthanolique. L'ergostérol est en effet une molécule clé de la résistance de *S. cerevisiae* à de nombreuses perturbations physiques et chimiques et son rôle dans la résistance à l'éthanol est fortement suspecté. Cette molécule représentant 1 lipide sur 2 dans la membrane plasmique est connue pour influencer la résistance à l'oxydation, la fluidité et la perméabilité des membranes plasmiques des levures. Nous avons souhaité mettre en œuvre une approche dynamique de la réponse biophysique de la membrane plasmique (variation de la perméabilité, de la fluidité et de la fonctionnalité membranaires) couplée à la réponse physiologique de la cellule en termes de viabilité et de variation de transcription de certains gènes-cibles.

PARTIE II : MATERIELS ET METHODES

CHAPITRE 1 : SOUCHES DE LEVURES ET CONDITIONS DE CULTURES

1.1. Souches de levures

L'ensemble des souches de levures utilisées au cours de cette étude ainsi que leur génotype sont présentés dans le tableau 4 suivant :

Tableau 4 : Génotypes des différentes souches de levures de *Saccharomyces cerevisiae* utilisées

Souches	Génotypes
Wild Type	(Mat) α ; his3 Δ 1 ; leu2 Δ 0 ; lys2 Δ 0 ; ura3 Δ 0
$\Delta erg6$	(Mat) α ; his3 Δ 1 ; leu2 Δ 0 ; lys2 Δ 0 ; ura3 Δ 0 ; YML008c::kanMX4
$\Delta erg2$	(Mat) α ; his3 Δ 1 ; leu2 Δ 0 ; lys2 Δ 0 ; ura3 Δ 0 ; YMR202w::kanMX4
$\Delta erg3$	(Mat) α ; his3 Δ 1 ; leu2 Δ 0 ; lys2 Δ 0 ; ura3 Δ 0 ; YLR056w::kanMX4
$\Delta erg5$	(Mat) α ; his3 Δ 1 ; leu2 Δ 0 ; lys2 Δ 0 ; ura3 Δ 0 ; YMR015c::kanMX4
$\Delta erg4$	(Mat) α ; his3 Δ 1 ; leu2 Δ 0 ; lys2 Δ 0 ; ura3 Δ 0 ; YGL012w::kanMX4

La souche sauvage (WT) de levure utilisée est *Saccharomyces cerevisiae* BY4742 (Euroscarf, Allemagne). Cette souche est très bien caractérisée et fait l'objet d'une bibliographie abondante dans de nombreux domaines. De plus, de nombreux mutants de cette souche sont disponibles.

L'ensemble des mutants utilisés sont issus d'une modification génétique de la souche sauvage BY4742. Les mutations portent sur la voie de biosynthèse de l'ergostérol et concernent les cinq dernières étapes de cette voie : $\Delta erg6$, $\Delta erg2$, $\Delta erg3$, $\Delta erg5$ et $\Delta erg4$. Ces mutants accumulent différentes natures de stérols (Fig. 19) et présentent l'avantage d'être cultivables dans un milieu classique de culture sans supplémentation particulière (Dupont *et al.*, 2011).

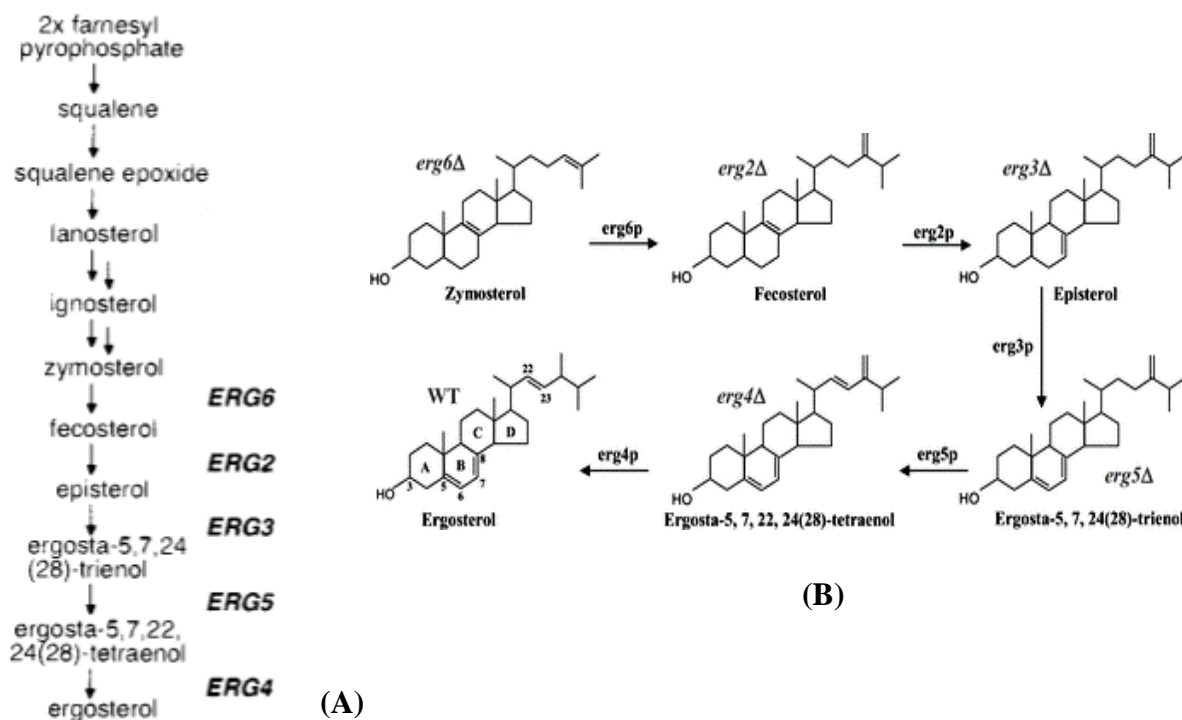


Figure 19 : Voie de biosynthèse de l'ergostérol

(A) Voie de biosynthèse de l'ergostérol à partir du farnésyl pyrophosphate (Eisenkolb *et al.*, 2002)

(B) Les cinq dernières étapes de la voie de biosynthèse de l'ergostérol chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Structures des principaux stérols accumulés par les mutants Δerg et la souche sauvage (Dupont *et al.*, 2011)

1.2. Milieu Malt Wickerham modifié gélosé

Les différentes souches de levures sont conservées à -80°C sous forme d'aliquotes contenant 1 mL d'une culture en phase stationnaire de croissance. A partir de ces aliquotes, des isollements sont réalisés par ensemencement sur boîtes de Pétri contenant du milieu Malt Wickerham modifié (MWm) gélosé pour les conserver à 4°C. La composition du milieu MWm est la suivante (QSP 1 L avec addition de glycérol : 51 g de glycérol pour 1000 g d'eau (Dupont *et al.*, 2011) :

Glucose	10 g/L
Extrait de levures	3 g/L
Peptone pancréatique	3 g/L

Dihydrogénophosphate de sodium NaH_2PO_4 1,5 g/L

Agar-agar 15 g/L

Le même milieu dépourvu d'agar est utilisé pour la réactivation des souches de levures et pour la réalisation des pré-cultures. Avant inoculation des levures, ces milieux sont stérilisés à l'autoclave à 120°C pendant 20 minutes.

1.3. Milieu Malt Wickerham modifié (MWm) enrichi en éthanol

Ce milieu est utilisé pour tester l'effet de concentrations croissantes en éthanol sur la croissance des souches. En fonction de la quantité d'alcool ajoutée, la composition est la suivante :

Le milieu a la même composition que le milieu MWm dépourvu d'agar. Mais pour 1L final de milieu MWm enrichi, on ajuste le volume à 960 mL et 920 mL, correspondant à 4% et 8% d'éthanol (v/v), respectivement. Après autoclavage à 120°C pendant 20 minutes puis refroidissement total des milieux, 4% ou 8% d'éthanol (v/v) sont ajoutés stérilement au milieu. Un dosage enzymatique de l'éthanol des milieux après préparation est réalisé afin de s'assurer de la concentration initiale en éthanol du milieu.

1.4. Moût synthétique

Ce milieu est utilisé pour réaliser les fermentations alcooliques. Sa composition est la suivante:

Glucose 100 g/L

Fructose 100 g/L

Extrait de levure 1 g/L

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g/L

Acide citrique 0,3 g/L

Acide L-malique 5 g/L

Acide L-tartrique 5 g/L

MgSO₄ 0,4 g/L

KH₂PO₄ 5 g/L

Le pH de ce milieu est ajusté à 3,5 à l'aide d'une solution NaOH 10 M. Le milieu est ensuite autoclavé à 120°C pendant 20 minutes.

1.5. Conditions de culture

1.5.1. Conduite des fermentations alcooliques (adaptation en conditions fermentaires)

Les levures sont cultivées 48 h sur le milieu liquide MWm, puis repiquées sur le même milieu. Après 24 heures de croissance à 25°C, les levures sont transférées dans le moût synthétique de façon à obtenir une population initiale de 10⁶ cellules/mL. Les fermentations sont menées à 25°C. La croissance des levures est estimée en réalisant un prélèvement par jour. La consommation de sucres et la production d'éthanol est mesurée après 7 jours de fermentation.

1.5.2. Croissance en présence d'éthanol (adaptation en conditions non fermentaires)

Pour étudier la résistance à différentes concentrations en éthanol, la réalisation des pré-cultures se fait de la même manière que précédemment. On inocule ensuite les milieux MWm enrichis en éthanol (50 mL en fioles de 250 mL) de façon à obtenir une population initiale de 10⁶ cellules/mL. Les fioles sont agitées (130 rpm) pendant 24 h sur une table d'agitation thermostatée à 28°C. La croissance est menée pendant 24 h et est contrôlée en réalisant un prélèvement à 0h, 4h, 8h, 12h et 24h.

1.5.3. Mode de culture et réalisation des chocs éthanol

1.5.3.1. Cultures statiques

Isolement

A partir d'une culture stock, chaque souche est isolée sur boîtes de Pétri contenant du milieu MWm gélosé. Les boîtes sont incubées 48 heures à 28°C.

Pré-culture

Après incubation, 2 ou 3 UFC (Unités Formant Colonies) sont prélevées et inoculées dans des tubes stériles contenant 10 mL de milieu liquide MWm. Les pré-cultures sont incubées 48 h à 25°C.

Culture

1 mL du milieu de pré-culture préalablement homogénéisé est déposé dans un tube contenant 9 mL de milieu liquide MWm. L'incubation dure 24 h à 25°C. Des suivis de croissance réalisés préalablement ont permis de s'assurer que les souches présentent le même comportement en croissance. Au bout de 24 heures, les populations sont d'environ 6.10^7 cellules/mL (début de phase stationnaire de croissance), quelle que soit la souche étudiée.

Réalisation des chocs éthanol

Les cultures sont centrifugées deux fois pendant 15 min à 6000 rpm à 25°C. Le surnageant est éliminé et le culot cellulaire est repris dans 10 mL d'eau glycérolée (51g de glycérol pour 1000 g d'eau). Après centrifugation, les levures sont transférées dans une solution binaire (eau/ éthanol) contenant du glycérol, (51 g de glycérol pour 1000 g d'eau) (notée tampon glycérolé). La population est de 10^6 cellules/mL.

Les tampons glycérolés sont préparés au préalable. Le volume est de 1 mL. Les concentrations en éthanol sont de 0%, 10% et 14% (v/v). La concentration en éthanol de chaque solution préparée a été vérifiée par dosage enzymatique (Boehringer-Mannheim).

Les chocs sont déclenchés lors de l'addition du volume de suspension cellulaire à chaque tampon glycérolé (température 25°C). A différents temps (0, 15, 30, 60, 120 et 180 min), on mesure le pourcentage de cellules dont l'intégrité de la membrane plasmique est altérée par cytométrie en flux, associée à un marquage à l'Iodure de Propidium (IP). Des dilutions en cascade sont également réalisées pour estimer la viabilité cellulaire sur boîte de Pétri.

1.5.3.2. Cultures agitées

Afin d'étudier l'impact des conditions de culture sur la résistance à un choc éthanol, les levures ont été cultivées sous agitation. Les pré-cultures et cultures sont réalisées à 25°C dans 25 mL de milieu MWm en erlenmeyers de 150 mL, sous agitation orbitale de 130 rpm. Les durées de pré-cultures et cultures sont inchangées par rapport aux conditions statiques. La réalisation des chocs éthanol (y compris la réalisation de chocs d'amplitude plus élevée, tels que 16%, 18%, 20%, 30% et 40% (v/v)) est conduite de la même façon que précédemment.

CHAPITRE 2 : METHODES ANALYTIQUES

2.1. Numération cellulaire et mesure de viabilité par hématimétrie

La numération des cellules est réalisée sous cellule de Thoma. La concentration cellulaire est donnée par la formule suivante :

$$X \text{ (cellules/mL)} = (\text{nb de cellules comptées}) / (\text{nb de grands carreaux comptés}) \times D \times 0,25 \times 10^6$$

Avec D = Facteur de dilution

La viabilité des levures est évaluée par comptage après coloration au bleu de méthylène. La suspension est mélangée volume à volume avec une solution de bleu de méthylène (0,1 g de bleu de méthylène dans un litre de solution de citrate de sodium à 2%). Après 10 min de contact, les cellules sont comptées au microscope. Les cellules viables apparaissent incolores alors que les mortes sont colorées en bleu. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules viables calculé par rapport au nombre total de cellules comptées sur la lame.

Les déterminations de la viabilité cellulaire sont également réalisées par la méthode de numération indirecte, par comptage des UFC (Unités Formant Colonies) sur boîte de Pétri. Les suspensions cellulaires prélevées au cours du temps sont étalées, après dilutions décimales, sur boîtes de Pétri contenant du milieu MWm gélosé. Les boîtes sont incubées pendant 2 jours à 28°C. La viabilité est déterminée en comparant le nombre des colonies issues de la suspension cellulaire choquée ou non choquée (témoin). Chaque expérience est réalisée en triplicat.

2.2. Evaluation de l'intégrité membranaire

L'évolution de la perméabilité de la membrane plasmique des levures au cours du choc éthanol est caractérisée à l'aide du marquage à l'Iodure de Propidium (IP). L'IP est une sonde qui ne pénètre que dans les cellules perméabilisées et fluoresce lors de sa complexation avec les acides nucléiques intracellulaires. Le taux de cellules perméabilisées est estimé grâce à l'analyse par cytométrie de flux (Chau *et al.*, 2008 ; Dupont *et al.*, 2011).

La cytométrie en flux permet l'étude précise de cellules isolées entraînées dans un flux liquide. C'est une technique d'analyse quantitative et qualitative de cellules et de particules en suspension. Elle permet l'étude de caractéristiques physiques et chimiques telles que la taille, la granulométrie et d'autres composants ou fonctions pouvant être détectés grâce à des sondes fluorescentes spécifiques. Le principe de fonctionnement de la cytométrie en flux est résumé dans la Figure 20.

Les cellules sont entraînées par un flux liquide et défilent à grande vitesse, cellule par cellule, dans le faisceau d'un ou plusieurs lasers (jusqu'à 30000 événements par seconde). La lumière ré-émise par les cellules (par diffusion ou fluorescence) permet de distinguer des sous-populations selon différents critères. De l'interaction entre le faisceau laser et les cellules, résultent des signaux lumineux de plusieurs natures :

- La lumière diffusée aux petits angles (FSC : Forward Scatter), collectée dans le prolongement du faisceau excitateur, correspond d'un point de vue physique à de la diffraction et donne une indication sur la taille des cellules.
- La lumière diffusée aux grands angles (SSC : Side Scatter), collectée à 90° par rapport au faisceau lumineux, est un mélange de diffusion, de réflexion et de réfraction, et donne des indications sur la granulométrie des cellules.
- La fluorescence émise peut être une autofluorescence ou résulter, comme c'est le plus souvent le cas, d'un marquage par un fluorochrome spécifique d'un constituant cellulaire particulier, ou d'un immunomarquage fluorescent.

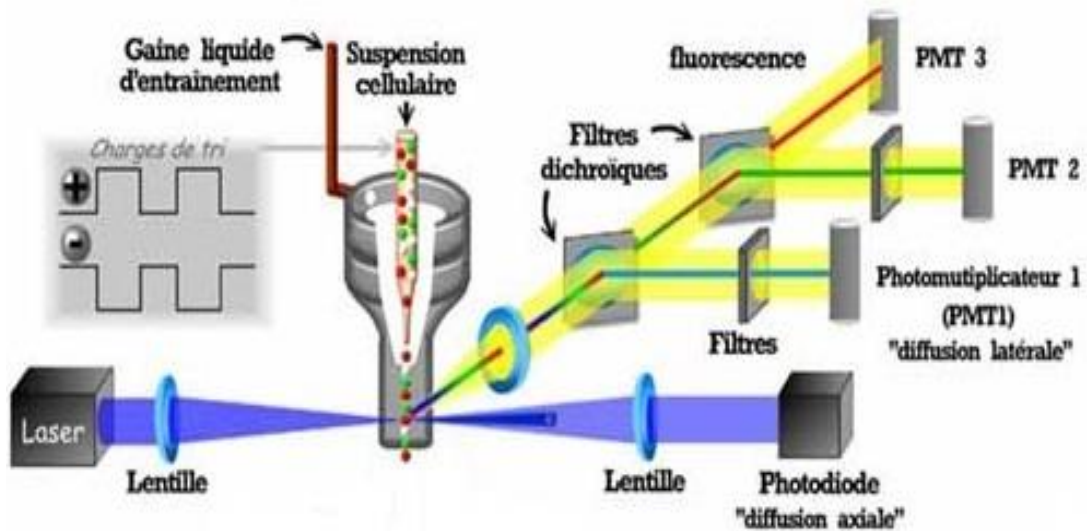


Figure 20 : Schéma du principe de fonctionnement d'un cytomètre en flux
(d'après <http://www.ifr87.cnrs-gif.fr/pbc/equipement/cytometre.html>)

Les signaux lumineux sont collectés par des photo-détecteurs (photodiode pour la diffusion petits angles, photomultiplicateurs pour la diffusion grands angles et la fluorescence) qui vont les transformer de façon proportionnelle en signaux électriques. Ces signaux sont ensuite envoyés à un analyseur multicanaux permettant la représentation de la répartition de la population analysée, en fonction du ou des paramètres étudiés.

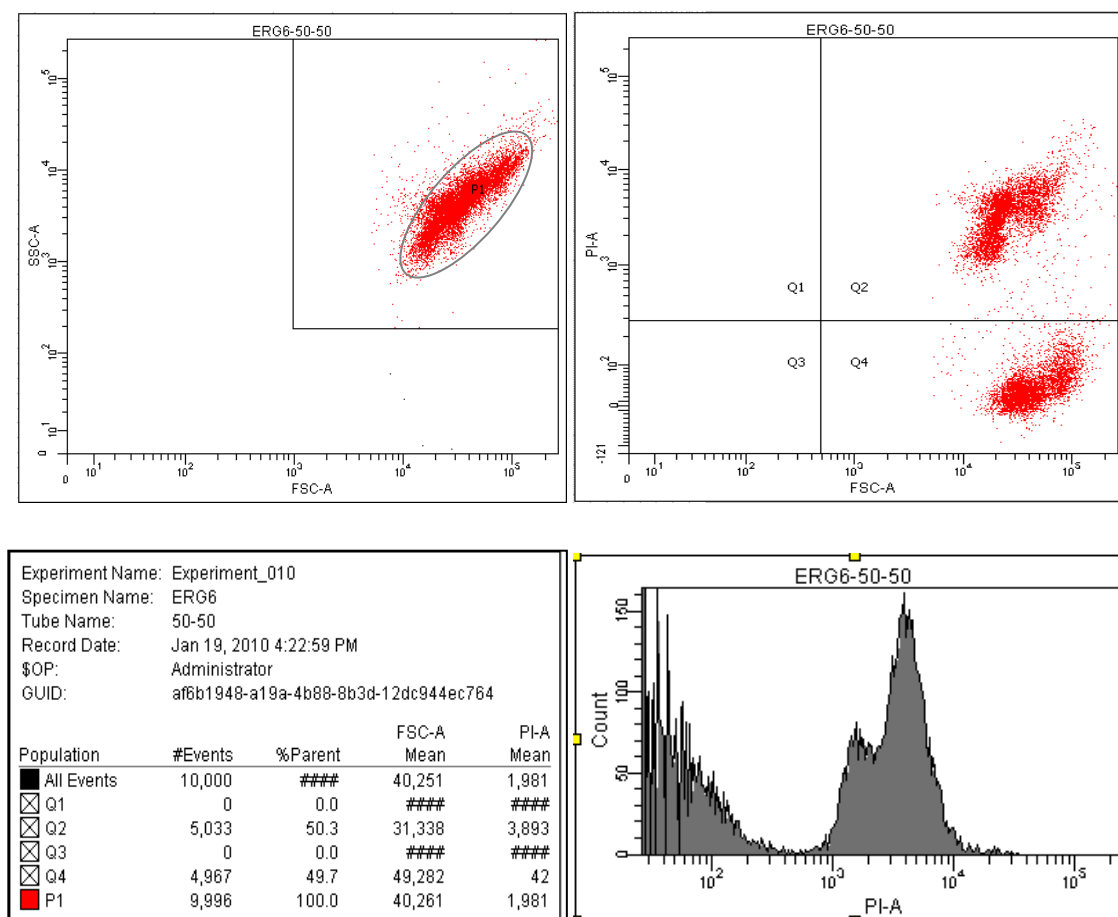


Figure 21 : Mise en place du protocole de marquage des levures perméabilisées par l'iodure de propidium. Exemple de résultats obtenus pour une suspension cellulaire comportant 50% de cellules perméabilisées.

Afin de marquer les levures par l'IP, une solution stock de sonde est préparée à 10 mg/mL dans de l'eau distillée. Plusieurs essais ont été réalisés afin d'optimiser la concentration de sonde en fonction de la concentration cellulaire. Pour cela, un mélange de cellule composé de 50% de cellules mortes (70°C, 10 min) et 50% de cellules vivantes a été préparé et différentes concentrations d'IP ont été testées (Fig. 21).

Suite au choc éthanol, on ajoute 2 µl de la solution stock d'IP dans le tube pour une concentration cellulaire de 10^6 UFC/mL. On homogénéise et on laisse incuber pendant 5 minutes à l'obscurité avant le transfert du tube dans le cytomètre. Pour chaque échantillon, 10000 événements sont collectés par le cytomètre de flux FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, USA) équipé d'un laser d'excitation argon à 488 nm. Un filtre optique à 610 nm est utilisé pour récupérer la fluorescence émise par les cellules. Les résultats sont issus au minimum de trois répétitions biologiques.

2.3. Dosage des sucres et de l'éthanol par méthode enzymatique

Les dosages des sucres réducteurs et de l'éthanol ont été réalisés à l'aide de kits enzymatiques (BioSenTec). Les dosages sont réalisés en fin de fermentation et en triplicat.

2.4. Mesure de la variation de la fluidité membranaire par anisotropie de fluorescence du TMA-DPH

La fluidité membranaire a été mesurée par anisotropie de fluorescence avec la sonde TMA-DPH (1-[4-(triméthylamino)phényl]-6-phényl-1,3,5-hexatriène). La technique de détermination de l'anisotropie de fluorescence a été optimisée. Les protocoles sont détaillés dans la section 2.2. de la partie Résultats-Discussion.

Pour la mesure de la fluorescence, les cellules sont marquées par le TMA-DPH sous agitation. Elles sont ensuite transférées dans une cuve placée dans un spectrofluorimètre (FLUOROLOG-3, Jobin Yvon, Inc., États-Unis) thermostaté à 25°C. Les valeurs d'anisotropie automatiquement calculées sont obtenues toutes les 8 secondes pendant 10 min après 30 min de stabilisation du signal. Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont de 360 nm et 450 nm, respectivement.

Les valeurs d'anisotropie (r) sont calculées selon l'équation de Shinitzky (Shinitzky 1984) :

$$r = \frac{I_{VV} - G.I_{VH}}{I_{VV} + 2.G.I_{VH}} \quad \text{avec } G = \frac{I_{VH}}{I_{HH}}$$

v et H désignent la direction de polarisation (verticale et horizontale)

Avec I : intensité de fluorescence corrigée obtenue par :

$$I_{HH} = I_{mHH} - I_{(TAMPON + CELLULE)HH} - I_{(TAMPON + SONDE)HH} + I_{(TAMPON)HH}$$

Avec :

I_m : intensité de fluorescence des cellules marquées

$I_{(TAMPON + CELLULE)}$: intensité de fluorescence de la suspension cellulaire non marquée

$I_{(TAMPON + SONDE)}$: intensité de fluorescence du tampon seul auquel est ajouté le TMA-DPH

$I_{(TAMPON)}$: intensité de fluorescence du tampon seul

Ce calcul est répété pour les trois autres signaux (I_{HV} , I_{VV} , I_{VH})

La mise en place de ce protocole a permis d'obtenir des ratios signaux/bruits de fond >30 pour les souches WT et $\Delta erg6$.

2.5. Etude transcriptomique par PCR quantitative en temps réel

La RT-qPCR (Reverse transcription-PCR quantitative) a été utilisée pour quantifier les niveaux d'expression de gènes cibles au cours du choc éthanol chez les souches WT et $\Delta erg6$. Cette méthode permet de quantifier les acides nucléiques ARN de façon soit absolue (les cinétiques sont mesurées pour différentes concentrations du gène cible ou transcrit) soit relative (l'expression de deux gènes de référence sont quantifiés en même temps que le (les) gène(s) étudié(s)). Le principe du temps réel en PCR repose sur la visualisation de la phase exponentielle de la réaction par un fluorochrome spécifique à l'ADN ou par une sonde oligonucléotidique fluorescente spécifique à une séquence (Tse & Capeau, 2003). Dans ce travail nous avons fait une quantification relative de gènes-cibles en utilisant le SYBR Green, un fluorochrome spécifique pour l'ADN. Les principales étapes concernant la méthode mise en œuvre sont décrites ci-dessous.

2.5.1. Extraction et purification de l'ARN

Suite au choc éthanol à 20% (v/v) pendant 15 min (noté « pulse » dans la partie Résultats-Discussion – section 2.3) et élimination de l'éthanol par lavage, les échantillons sont prélevés à différents temps d'incubation (0, 15, 30 et 60 min). Pour l'extraction et purification de l'ARN total à l'aide de la méthode au Tri Reagent[®], la quantité de biomasse de chaque échantillon est estimée par mesure de DO_{600} (Densité Optique à 600 nm) et doit correspondre à environ 10 unités (soit 10^8 cellules/mL). L'échantillon est lavé stérilement deux fois avec de l'eau RF (RNase Free) puis les cellules sont récupérées par centrifugation à 5000g, 10 min à 4°C. Les cellules sont resuspendues dans 1 mL de Tri Reagent[®] sous hotte aspirante et transférées dans un microtube (tube adapté au Precellys 24, Bertin technologies, France) contenant 400 mg de billes en verre de 0,5 μm de diamètre stérilisées. Pour casser les cellules, les microtubes sont placés dans le « Precellys 24 » avec 6 cycles de 30s, avec des intervalles de refroidissement de 60s dans la glace pillée. Le surnageant est récupéré par

centrifugation à 12000g pendant 15 min à 4°C. Pour extraire les acides nucléiques, on ajoute 200 µL de chloroforme 99%, puis on mélange en retournant les tubes plusieurs fois. Le surnageant est récupéré par centrifugation à 12000g pendant 10 min à 4°C. Après une deuxième extraction avec du chloroforme, les acides nucléiques sont précipités par 500 µL d'isopropanol. Après mélange, on laisse à température ambiante pendant 10 min. Les acides nucléiques sont récoltés par centrifugation à 12000 g pendant 10 min à 15°C. Ensuite, on lave deux fois les culots avec 1mL d'éthanol à 70%, suivi d'une centrifugation à 12000g pendant 5 min à 15°C. Les culots sont séchés à température ambiante et re-suspendus dans 20 à 50 µL d'eau RF (selon la taille du culot). Les quantités d'ARN sont dosées au spectrophotomètre à 280 nm ($1.8 < A_{260nm}/A_{280nm} < 2.0$).

2.5.2. Traitement à la DNase

Pour éliminer toute trace d'ADN génomique dans les échantillons d'ARN, on fait un traitement à la DNase (Fermentas Deoxyribonuclease I (DNase I), RNase free ; Référence : #EN0521). Les réactions contenant environ 4 µg d'ARN, 3 µL de « Tampon DNase (10x) », 3 µL de DNase I et de l'eau RF (jusqu'à un volume de 30 µL) sont déclenchées par incubation à 37°C pendant 30 min. Pour arrêter la réaction, on ajoute 3 µL d'EDTA (25 mM) et on incube à 65°C pendant 10 min. Les échantillons sont ensuite refroidis dans la glace et conservés à -20°C. Les ARN purifiés sont dosés au spectrophotomètre à 280 nm ($1.8 < A_{260nm}/A_{280nm} < 2.0$).

2.5.3. Contrôle du traitement à la DNase

Afin de vérifier l'absence d'ADN génomique dans les échantillons d'ARN, on réalise une PCR en temps réel avec 5 µL des échantillons traités à la DNase. Comme témoin positif on utilise 5 µL d'ADN génomique de *S. cerevisiae*; comme témoin négatif on utilise 5 µL d'eau RF.

2.5.4. Synthèse d'ADNc

Pour synthétiser l'ADNc, on utilise le kit Bio-Rad iScript™ cDNA Synthesis Kit (Réf : 170-

8891). La réaction se fait dans un volume final de 40 μL contenant: 8 μL de « Tampon iScript (5x) » ; 2 μL de « iScript » ; 2 μg d'ARN et de l'eau RF (qsp 40 μL). Une incubation est réalisée en thermocycleur 5 min à 25°C pour activer l'enzyme, puis 30 min à 42°C de façon à ce que l'activité de la reverse-transcriptase soit maximale. Un traitement final pendant 5 min à 85°C permet de dénaturer et inactiver l'enzyme. Pour stopper la réaction, on ajoute 80 μL d'eau RF et on conserve les échantillons à -20°C.

2.5.5. RT-PCR quantitative

Les qRT-PCR sont réalisées sur 4 dilutions en cascade au $\frac{1}{4}$ des ADNc (1/4 ; 1/16 ; 1/64 ; 1/256) en utilisant du Bio-Rad iQTM SYBR[®] Green Supermix (Réf : 170-8880). Pour chaque dilution, le mélange de PCR suivant est réalisé : 5 μL d'ADNc ; 12,5 μL d'iQTM SYBR[®] Green Supermix ; 2 μL d'amorces mélangées (7 pmol/ μL) ; 5,5 μL d'eau RF. Les réactions sont réalisées dans des plaques de 96 puits, dans un thermocycleur relié à un détecteur de fluorescence et à un ordinateur permettant l'enregistrement des données grâce au logiciel iCycler. Le programme du thermocycleur est le suivant :

* Dénaturation initiale : 3 min à 95°C.

* Dénaturation : 30s à 95°C/ Hybridation et élongation : 30s à 60°C/ Mesure de la fluorescence → 40 cycles.

* Melt curve 65°C à 95°C par palier de 0,5°C/10s.

Les amorces pour la RT-PCR (gènes-cibles et gènes de référence) sont présentées dans le Tableau 5. Ces amorces ont été « designées » en utilisant le logiciel en ligne Primer 3 0.4.0 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>). Les amorces ont été conçues selon les critères suivants : longueur d'environ 19 à 22 bases, teneur en G/C de plus de 50% ; T_m d'environ 60°C. Les tailles des produits de PCR varient entre 90 à 120 pb.

Tableau 5 : Gènes et amorces utilisées dans la RT-qPCR

Gènes	Description	Amorce séquence 5'----> 3'	Taille (pb)
AHP1	alkylhydroperoxide reductase	GCCAAAGTGATGCTGACAGT	20
		CAGCTGGAGCACCGGTAAT	19
CTT1	catalase T	AGACCAGACGGCCCTATCTT	20
		CCACCTTTGGCATGGACTAC	20
SOD1	superoxide dismutase	CACCATTTTCGTCCGTCTTT	20
		TGGTTGTGTCTCTGCTGGTC	20
SOD2		CTCCGGTCAAATCAACGAAT	20
		CCTTGGCCAGAAGATCTGAG	20
PGK1	3-phosphoglycerate kinase	GGTAACACCGTCATCATTGG	20
		AAGCACCACCACAGTAGAGA	21
TDH2	glyceraldehyde-3-phosphat dehydrogenase, isozyme 2	AACATCATCCCATCCTCTACCG	22
		GGACTCTGAAAGCCATACCG	20

La quantité relative de l'expression de chaque gène est mesurée avec la méthode $\Delta\Delta C_t$ (Livak & Schmittgen, 2001) dans laquelle la quantité d'ADNc cible est ajustée par rapport à deux références, constituées par la quantité d'ADNc des contrôles internes. Les résultats ont été normalisés à l'aide de deux gènes de référence *PGK1* et *TDH2*.

La formule de calcul utilisée est la suivante : Expression relative = $2^{-\Delta\Delta C_t}$

où :

$$\Delta C_t = C_{t \text{ gène cible}} - C_{t \text{ gène de référence}}$$

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t \text{ échantillon}} - \Delta C_{t \text{ contrôle}}$$

* Contrôle: ARN cible de *S. cerevisiae* dans le milieu sans éthanol (cellules non stressées)

* Echantillon: ARN cible de *S. cerevisiae* dans le milieu contenant 20% v/v éthanol (cellules stressées suite à l'application du « pulse »).

L'expression relative d'un gène calculée avec cette méthode est interprétée de la manière suivante :

- Expression relative > 2 : le gène est surexprimé
- Expression relative $< 0,5$: le gène est réprimé
- Expression relative = entre 0,5 et 2 : le gène est exprimé.

Selon Desroche *et al.* (2005), on considère qu'un gène est significativement réprimé ou surexprimé si son niveau d'expression relative est au moins deux fois plus faible ou deux fois plus élevé par rapport aux conditions contrôles décrites plus haut.

2.6. Analyse statistique

L'ensemble des données est traité par le test de Student t (logiciel XLSTAT-Pro v7.5.2). L'intervalle de confiance pour une différence de moyenne est fixé à 95% ($P \leq 0.05$) pour toutes les comparaisons.

PARTIE III : RESULTATS ET DISCUSSION

L'objectif général des expériences présentées est de caractériser les effets de l'augmentation de la concentration en éthanol dans le milieu sur l'évolution structurale et fonctionnelle de la membrane plasmique de la levure *Saccharomyces cerevisiae*, afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la survie ou la mort cellulaire lors de ce type de perturbations.

Deux types d'approches ont été mis en œuvre, présentés sous forme de deux chapitres. Le premier chapitre concerne la recherche de conditions d'application de perturbations éthanoliques (augmentation de la concentration en éthanol) conduisant à la mort ou à la survie des levures et permettant également de discriminer les différentes souches étudiées. L'étude préliminaire nous a permis de retenir plus particulièrement un mutant sensible ($\Delta erg6$) que nous avons soumis à des stress éthanoliques d'amplitude croissante. Nous nous sommes focalisés sur deux réponses physiologiques engendrées par les stress éthanol : une réponse instantanée en estimant le pourcentage de cellules dont la membrane plasmique est altérée (cytométrie de flux après marquage des cellules à l'IP) et une réponse physiologique globale traduite par la détermination de la viabilité sur boîtes de Pétri. Le deuxième chapitre se concentre sur l'étude de la survie des levures (souches sauvage et mutante $\Delta erg6$) en appliquant le stress éthanol sous forme de « pulse » (20% v/v d'éthanol – 15 minutes). Trois approches expérimentales ont été mises en œuvre. Premièrement, la viabilité cellulaire, corrélée à la mesure du taux de perméabilisation membranaire a été suivie suite à l'application du stress éthanol sous la forme de « pulse ». Deuxièmement, l'effet fluidifiant de l'éthanol en relation avec la nature des stérols présents a été quantifié chez les deux souches. Cet effet a été évalué par mesures d'anisotropie de fluorescence sur cellules entières avec marquage au TMA-DPH. Troisièmement, pour estimer l'influence du choc éthanol appliqué sous forme de « pulse » sur la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), nous avons complété l'analyse par une analyse transcriptomique de quatre gènes-cibles, codant pour des enzymes impliquées dans la protection cellulaire vis-à-vis de l'oxydation.

L'ensemble des résultats obtenus sont comparés et discutés dans la Discussion générale qui fait suite à l'exposé et à la discussion des résultats expérimentaux.

CHAPITRE I : ETUDE DE L'EFFET DE L'ETHANOL SUR LA TOLERANCE ET LA CROISSANCE DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* WILD TYPE ET DE SES MUTANTS AFFECTES DANS LA VOIE DE SYNTHÈSE DE L'ERGOSTEROL (Δ ERG)

Dans ce chapitre sont présentées les expériences préliminaires dont le but est de cribler différents paramètres susceptibles de moduler la survie des souches de levure utilisées dans cette étude (la souche sauvage *Saccharomyces cerevisiae* BY4742 et 5 souches délétées pour la synthèse d'une des cinq enzymes intervenant dans l'une des cinq dernières étapes de la voie de biosynthèse de l'ergostérol : Δ erg6, Δ erg2, Δ erg3, Δ erg5, et Δ erg4) (Fig. 19). Les différentes souches ont été préalablement testées en conditions fermentaires, puis nous avons réalisé des suivis de croissance en conditions aérobies sur milieu MWm enrichi en éthanol. Enfin, le comportement des souches a été étudié suite à des chocs éthanol, réalisés post-croissance. La cinétique et l'amplitude de concentration en éthanol (de 4 à 40% v/v) sont les deux paramètres cruciaux influant sur la survie des levures lors de perturbation éthanolique. L'influence de ces paramètres dépend de la souche de micro-organismes. Ainsi, ces résultats sont essentiels afin de définir un champ d'étude et de cibler les manipulations nécessaires pour la compréhension des mécanismes impliqués dans la mort ou dans la survie des cellules lors d'un choc éthanol.

1.1 Croissance des souches en conditions fermentaires

Les 6 souches de *S. cerevisiae* (WT et 5 souches mutantes) sont ensemencées en moût synthétique. Les cinétiques de croissance, ainsi que la consommation des sucres et la production d'éthanol post fermentation alcoolique (FA) sont présentées dans les Figure 22 et Tableau 6 suivants. Les résultats sont issus de 3 répétitions biologiques.

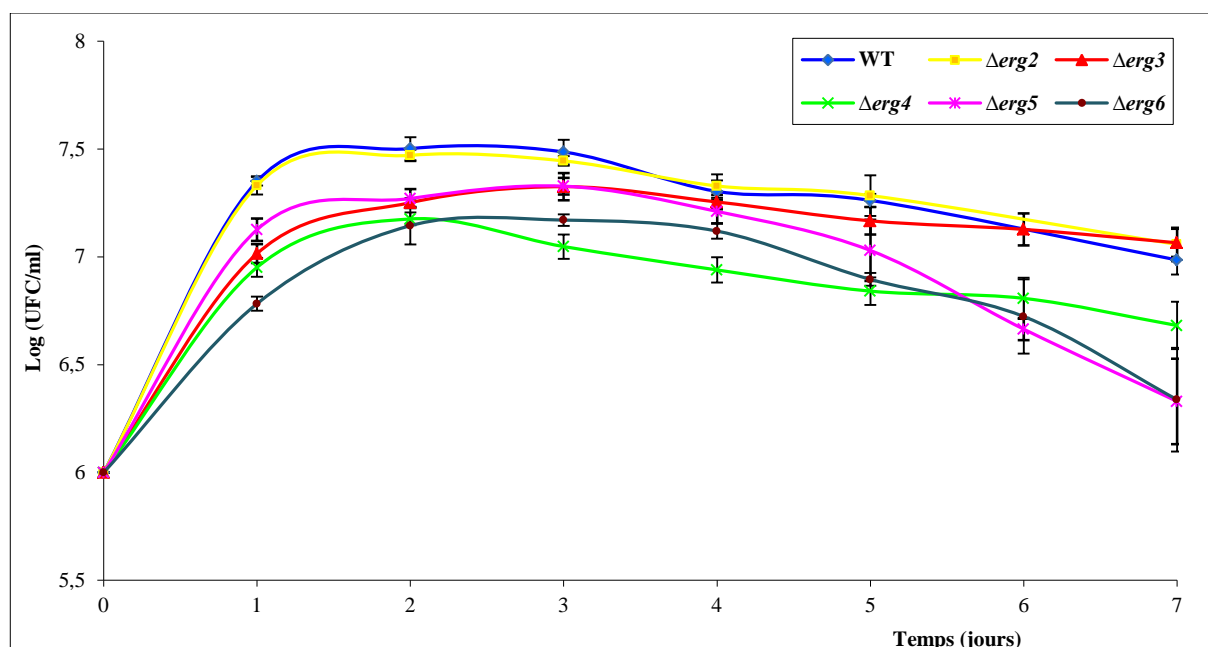


Figure 22 : Suivi de croissance sur moût synthétique (25°C) des différentes souches de *S. cerevisiae* pendant 7 jours

Tableau 6 : Consommation des sucres et production d'éthanol après 7 jours de fermentation sur moût synthétique

	WT	$\Delta erg2$	$\Delta erg3$	$\Delta erg4$	$\Delta erg5$	$\Delta erg6$
Consommation de fructose (g/L)	18,5±3,9	22,2±2,45	16,3±2,15	10,9±2,45	15,1±1,53	14,2±2,15
Consommation de glucose (g/L)	27,9±2,44	29,8±2,14	29,6±3,66	15,4±2,44	26,2±0,61	17,5±1,83
Concentration en sucres consommé (g/L)	46,4	52,0	45,9	26,3	41,3	31,7
Concentration en éthanol % (v/v)	1,52±0,32	1,85±0,15	1,87±0,41	1,69±0,37	2,58±0,34	2,91±0,21

Les courbes de croissance des six souches étudiées (Fig. 22) se caractérisent par l'absence d'une phase de latence, par une phase active de croissance (24 heures) suivie d'une phase stationnaire. Seules les cultures des souches $\Delta erg4$, $\Delta erg5$ et $\Delta erg6$ présentent une phase de déclin à partir du 3^{ème} jour de fermentation.

L'absence de phase de latence peut s'expliquer par le fait que les levures s'adaptent rapidement au milieu. La phase active de croissance se caractérise par une prolifération

importante de la biomasse. Cette phase dure environ 24 heures pour la souche Wild type et les mutants $\Delta erg2$ et $\Delta erg5$. Il faut 24 heures supplémentaires pour atteindre la phase stationnaire pour les trois autres mutants.

Partant d'une population initiale presque identique (aux alentours de 10^6 cellules/mL), les six souches ont atteint des populations finales différentes. La souche WT produit la biomasse maximale la plus élevée ($2,9 \cdot 10^7$ cellules/mL) suivie par la souche $\Delta erg2$, alors que les 4 autres souches atteignent des niveaux de biomasses maximales moins élevés (Fig. 22).

Parallèlement à la croissance, nous constatons que pour les 6 souches après 7 jours de fermentation, les sucres ne sont que très partiellement consommés. Ce sont les souches $\Delta erg4$ et $\Delta erg6$ qui consomment le moins de sucres au cours de la fermentation avec 26,3 g/L et 31,7 g/L de sucres consommés, respectivement en fin de fermentation. Les concentrations en éthanol obtenues en fin de fermentation sont également étonnamment faibles pour la souche WT (1,52% v/v d'éthanol produit). Peu de données bibliographiques décrivent le comportement physiologique de cette souche cultivée en conditions fermentaires. Nos résultats laissent supposer de faibles capacités intrinsèques fermentaires pour cette souche de référence. A noter que les mutants $\Delta erg5$ et $\Delta erg6$ synthétisent plus de 2,5% v/v d'éthanol, avec des rendements fermentaires de 16,0 et 10,9 (g /l sucres consommés pour 1% ethanol formé), respectivement [les valeurs de rendements fermentaires sont de l'ordre de 17 g/l de sucre pour 1% éthanol, chez une levure de vinification].

Cette première série d'expériences, visant à trouver des conditions expérimentales de croissance discriminantes entre les différents mutants, n'a pas été renouvelée. En effet, non seulement la souche WT, témoin de notre expérimentation ne semble pas présenter de capacités fermentaires, mais de plus, la conduite de croissance dans des milieux de fermentation très riches en sucres peut induire des chocs osmotiques au moment de l'inoculation des cellules, complexifiant l'analyse des résultats. Nous avons donc choisi une autre stratégie pour étudier l'impact d'un stress éthanol en relation avec la synthèse de stérols levuriens.

1.2 Effet de la concentration en éthanol sur la croissance des souches

Les suivis de croissances des souches en conditions aérobies en milieu MWm enrichi en éthanol ont été réalisés comme présenté dans le paragraphe 1.3 de la partie Matériels et

Méthodes. Deux concentrations en éthanol ont été testées : 4% et 8% (v/v). Les courbes de croissances des 6 souches sont présentées dans la Figure 23. Le Tableau 7 présente l'effet des concentrations en éthanol sur la population maximale obtenue à 24 heures et sur les taux de croissance pour les 6 souches testées.

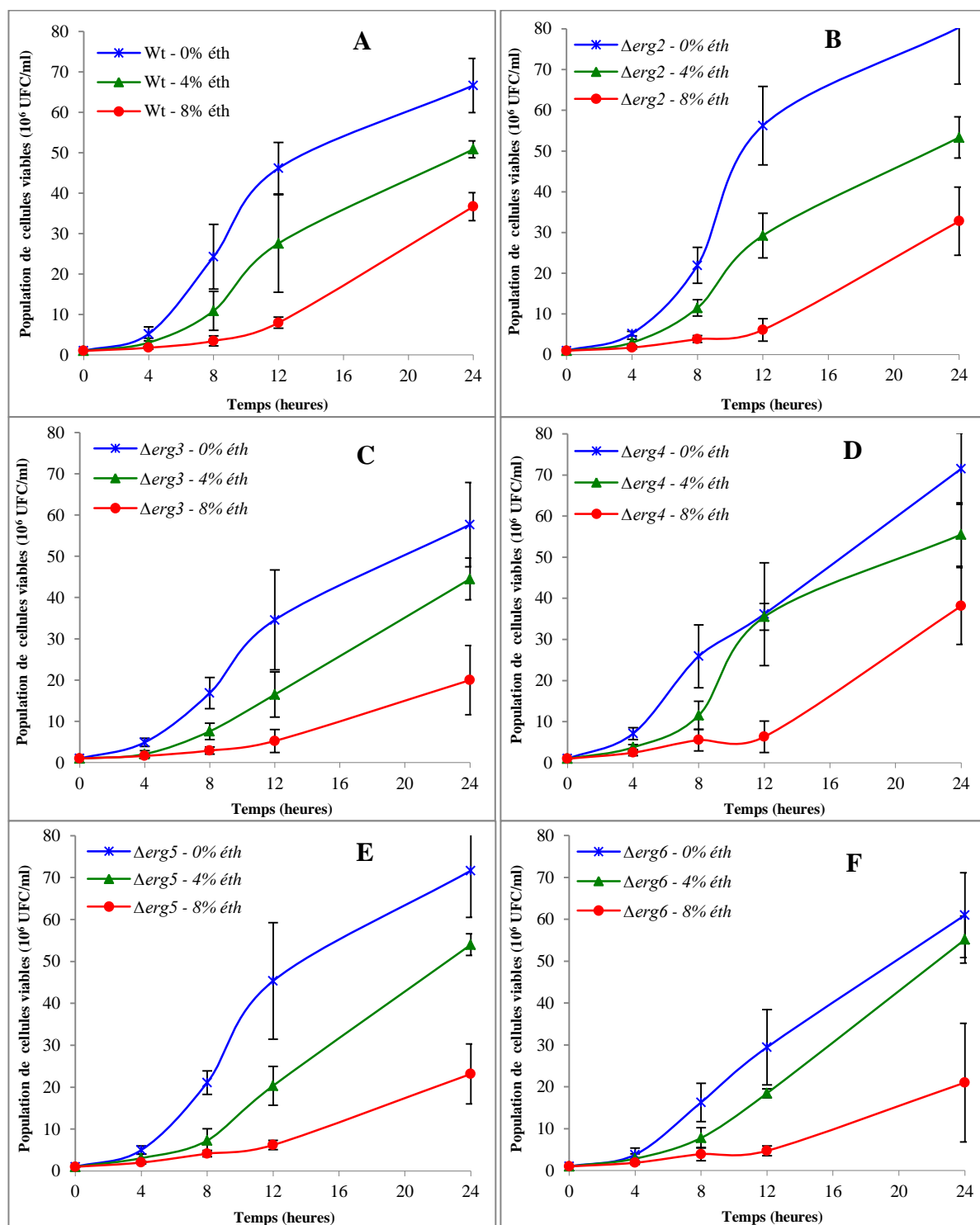


Figure 23 : Effet de la concentration en éthanol (0, 4 et 8%) sur la croissance des 6 souches (WT, $\Delta erg2$, $\Delta erg3$, $\Delta erg4$, $\Delta erg5$, et $\Delta erg6$ correspondant aux figures 1A, 1B, 1C, 1D, 1E et 1F) en conditions aérobies.

Tableau 7 : Effet de l'éthanol dans le milieu de croissance sur la biomasse maximale (obtenue à 24 heures) et sur les taux de croissance (croissance sur milieu MWm à 25°C)

Souches	[éthanol] ajouté % (v/v)	Population maximale (10^6 UFC/mL)	μ_{\max} (h^{-1})
WT	0%	$66,67 \pm 6,71^{ac*}$	0,38
	4%	$50,87 \pm 2,12^{be}$	0,23
	8%	$37,10 \pm 3,46^{df}$	0,13
<i>$\Delta erg2$</i>	0%	$80,33 \pm 13,88^a$	0,36
	4%	$53,33 \pm 5,05^{be}$	0,23
	8%	$32,78 \pm 8,38^{ef}$	0,14
<i>$\Delta erg3$</i>	0%	$57,66 \pm 10,21^{ac}$	0,31
	4%	$44,50 \pm 5,22^{ce}$	0,19
	8%	$20,00 \pm 3,88^f$	0,11
<i>$\Delta erg4$</i>	0%	$71,50 \pm 8,67^{ab}$	0,32
	4%	$55,50 \pm 7,69^{ac}$	0,28
	8%	$38,13 \pm 9,32^{df}$	0,15
<i>$\Delta erg5$</i>	0%	$71,67 \pm 11,18^{ab}$	0,36
	4%	$54,00 \pm 2,59^{be}$	0,26
	8%	$23,15 \pm 7,17^f$	0,11
<i>$\Delta erg6$</i>	0%	$61,00 \pm 10,11^{ad}$	0,36
	4%	$55,17 \pm 5,62^{ac}$	0,22
	8%	$21,02 \pm 14,15^f$	0,12

(*) Les valeurs sont une moyenne de trois répétitions biologiques. Le test de significativité est réalisé par une ANOVA ($P \leq 0,05$) à un facteur. Les valeurs dotées de mêmes lettres ne sont pas significativement différentes suivant le test Student *t*.

La population initialeensemencée est, pour toutes les souches, d'environ 10^6 cellules/mL. En l'absence d'éthanol (témoin, 0% v/v), nous constatons pour toutes les souches une phase de latence d'environ 3 heures. Les taux de croissance sont comparables (de l'ordre de $0,36 h^{-1}$). En présence de 4% d'éthanol, les temps de latence sont doublés. En présence de 8%, nous constatons des temps de latence d'environ 12 heures, quelles que soient les souches étudiées. Les taux de croissances maximaux de la souche WT sont $0,23$ et $0,13 h^{-1}$, pour 4 et 8% d'éthanol, respectivement. Les niveaux de populations maximaux sont de $5,1 \cdot 10^7$ et $3,7 \cdot 10^7$ cellules/mL, respectivement.

Les résultats obtenus pour la souche $\Delta erg2$ sont similaires. Pour $\Delta erg3$, les populations maximales obtenues à 24 heures ($4,4.10^7$ et $2,0.10^7$ cellules/mL) sont plus faibles. Les taux de croissance sont également plus faibles par rapport aux 5 autres souches analysées, avec 0,19 et $0,11\text{ h}^{-1}$, à 4 et 8% d'éthanol, respectivement.

C'est la souche $\Delta erg4$ qui présente les taux de croissances les plus élevés, avec 0,28 et $0,15\text{ h}^{-1}$, pour 4 et 8%, respectivement. Les niveaux de populations maximaux sont légèrement plus élevés, en comparaison avec les autres souches, avec $5,5.10^7$ et $3,8.10^7$ cellules/mL, respectivement. Nous pouvons également remarquer pour 4% d'éthanol, une courbe de croissance biphasique, avec une population mesurée à 12 heures, identique à celle obtenue en absence d'éthanol.

Les populations et les taux de croissances pour les souches $\Delta erg5$ et $\Delta erg6$ sont similaires à ceux obtenus pour $\Delta erg3$, en présence de 8% d'éthanol. Ces deux souches présentent des populations maximales à 24 heures de $2,3.10^7$ et de $2,1.10^7$ cellules/mL en présence de 8% d'éthanol.

Ces résultats laissent supposer qu'il faut imposer une concentration relativement élevée (8% d'éthanol) pour observer des différences entre la souche Wild type et les 5 mutants étudiés. Le mutant $\Delta erg4$ semble plus adapté que WT, avec une biomasse supérieure obtenue, quelle que soit la concentration en éthanol testée. La souche $\Delta erg2$, quant à elle, se comporte comme le témoin. Les mutants les plus sensibles sont $\Delta erg3$, $\Delta erg5$ et $\Delta erg6$.

1.3. Effet d'un choc éthanol sur la viabilité de la souche WT et la souche mutante $\Delta erg6$

Pour étudier le comportement des souches soumises à un choc éthanol, nous avons retenu la souche sauvage, Wild type (souche de référence) et un seul mutant, $\Delta erg6$, présentant la plus grande sensibilité à la présence d'éthanol dans le milieu de croissance.

Le choix d'étudier un seul mutant ($\Delta erg6$) est conditionné par le fait que ce mutant est souvent comparé dans la littérature à la souche sauvage en ce qui concerne son comportement vis-à-vis de nombreux stress, tels que les stress osmotiques, thermiques et oxydatifs (Sharma, 2006 ; Abe *et al.*, 2009 ; Dupont *et al.*, 2011, 2012). De plus, le gène *erg6* intervient le plus tôt dans la voie de synthèse de l'ergostérol et le mutant $\Delta erg6$ est la première souche mutante viable dans les conditions standards de croissance. Ce mutant accumule principalement le zymostérol (Zinser *et al.*, 1993 ; Munn *et al.*, 1999).

1.3.1. Comparaison de l'effet d'un choc éthanol (10 et 14%) sur cellules cultivées en conditions statiques ou sous agitation

Deux chocs éthanol ont été testés (10 et 14% v/v) sur un temps total de 3 heures. Les cellules sont cultivées en conditions statiques ou sous agitation.

1.3.1.1. Cultures statiques

Afin d'étudier l'impact des conditions de culture sur la levure soumise à un choc éthanol, nous avons cultivé les levures sans agitation. Les pré-cultures et cultures sont réalisées dans les tubes stériles contenant 10mL de milieu MWm. Ensuite, les levures lavées sont transférées dans 1mL de solution binaire (eau/glycérol) de façon à obtenir une population initiale de 10^6 cellule/mL. L'effet des chocs éthanol à 10 et 14% sur la membrane plasmique est mesuré par cytométrie en flux (marquage IP) et la viabilité des cellules est mesurée par méthode UFC (minimum 3 répétitions biologiques). La Figure 24 (A, B et C) présente le taux de cellules altérées et la Figure 25 (A, B et C) présente l'évolution de la viabilité cellulaire des souches. Les deux souches WT et $\Delta erg6$ ont été préalablement cultivées en conditions statiques sur milieu MWm et récoltées après 24 heures de croissance. Dans chaque cas, un témoin est réalisé (absence d'éthanol dans le tampon).

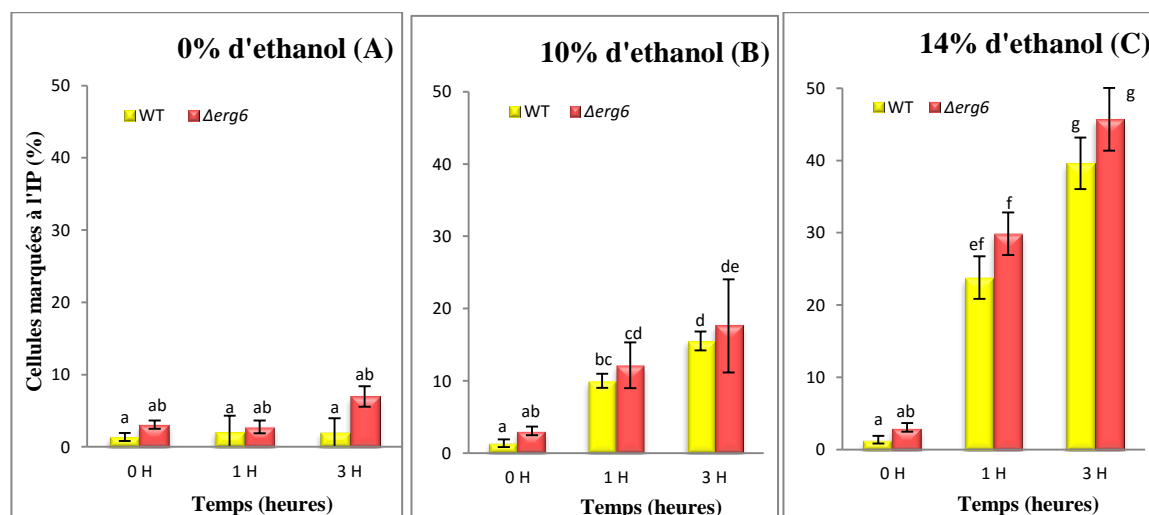


Figure 24 : Evolution des pourcentages de cellules perméabilisées (marquées par l'IP) pour les souches WT et $\Delta erg6$ au cours d'un choc éthanol à 0% (A témoin), 10% (B) et 14% (C) réalisé sur un temps total de 3 heures. Cultures non agitées. Chocs réalisés dans une solution binaire : eau-glycérol. Les valeurs sont une moyenne de trois répétitions biologiques. Le test de significativité est réalisé par une ANOVA ($P \leq 0,05$) à un facteur. Les valeurs dotées de mêmes lettres ne sont pas significativement différentes suivant le test Student *t*.

La Figure 24 montre que les cellules maintiennent leur intégrité membranaire en l'absence d'éthanol. En effet, les proportions de cellules perméabilisées après 3 heures sont de 2 et 7% pour les souches WT et $\Delta erg6$, respectivement. En revanche, la membrane des deux souches est affectée en présence de 10% et 14% d'éthanol. Après une heure de maintien en présence de 10% d'éthanol, on a 10,0 % et 12,1% de cellules dont la membrane est perméabilisée pour les souches WT et $\Delta erg6$, respectivement. Après 3 heures de traitement, ces proportions atteignent 15,5% et 17,6%, respectivement pour les souches WT et $\Delta erg6$.

D'une manière similaire, le choc éthanol à 14% pendant 1 heure entraîne des taux de cellules perméabilisées compris entre 23,8% et 29,9% et des taux de 39,6 % et 45,7% après 3 heures de traitement, respectivement pour les souches WT et $\Delta erg6$.

Il n'y a pas de différence significative des valeurs obtenues pour les deux souches.

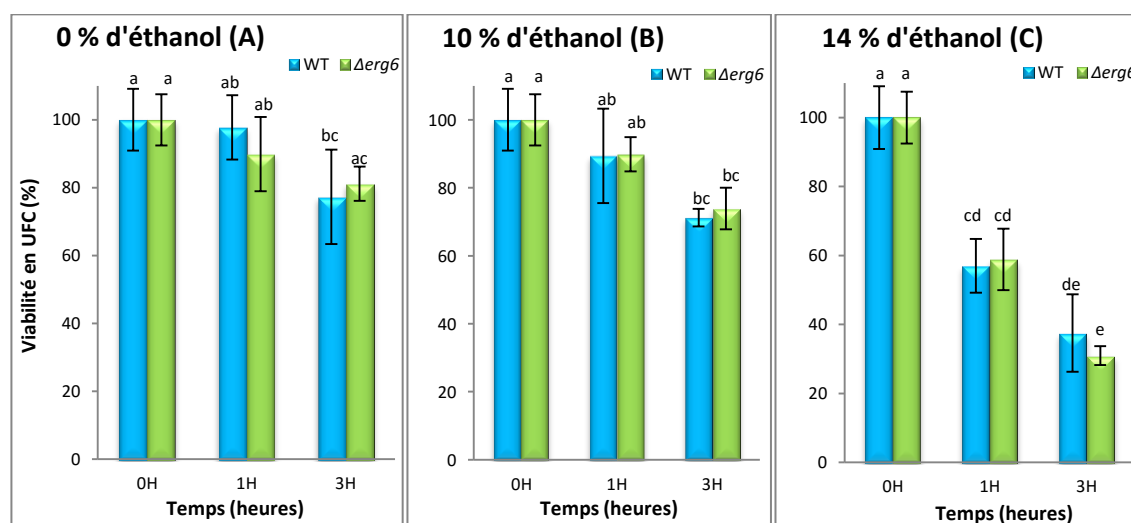


Figure 25 : Evolution de la viabilité des levures (méthode UFC) exprimée en pourcentage au cours d'un choc éthanol à 0% (A-témoin), 10% (B) et 14% (C) – 100% correspond à la population initiale (10^6 cellules/mL). Cultures non agitées. Chocs réalisés dans une solution binaire : eau-glycérol. Les valeurs sont une moyenne de trois répétitions biologiques. Le test de significativité est réalisé par une ANOVA ($P \leq 0,05$) à un facteur. Les valeurs dotées de mêmes lettres ne sont pas significativement différentes suivant le test Student *t*.

Concernant l'évolution de la viabilité des levures (Fig. 25), la viabilité des cellules se maintient après 1 heure d'incubation en absence d'éthanol (témoins). Après trois heures, la viabilité chute à 77 et 80%, respectivement pour les souches WT et $\Delta erg6$.

A 10% d'éthanol, au bout d'une heure, on perd environ 10% de viabilité pour les deux souches. La perte est de 30% après 3 heures pour tous les deux souches WT et $\Delta erg6$.

De la même manière, pour 14% d'éthanol, on observe une perte de viabilité d'environ 40% après 1 heure et de 65% après 3 heures, pour les deux souches.

L'ensemble de ces résultats démontre que le choc éthanol entraîne une altération de l'intégrité membranaire (perméabilisation) des cellules, quantifiable après 1 heure de traitement. Si la prolongation de l'incubation pendant 3 heures ne semble pas modifier le taux d'altération membranaire lors du choc à 10% d'éthanol, on observe une augmentation du taux d'altération (de 30 à 40% environ de cellules perméabilisées) si on prolonge le temps de choc à 3 heures en présence de 14% d'éthanol.

Les taux de perméabilisation observés sont corrélables aux taux de mortalité observés par méthode UFC.

L'ensemble des résultats ne révèle pas de différence significative entre les souches WT et $\Delta erg6$, que ce soit sur l'intégrité de la membrane ou sur la viabilité.

1.3.1.2. Cultures sous agitation

Le même protocole de culture que précédemment est suivi, excepté que les pré-cultures et cultures sont réalisées dans 25 mL de milieu en erlenmeyers de 150 mL, sous agitation orbitale de 130 rpm. La Figure 26 (A, B et C) présente le taux de cellules perméabilisées et la Figure 27 (A, B et C) présente l'évolution de la viabilité cellulaire des souches WT et $\Delta erg6$ préalablement cultivées sous agitation sur milieu MWm. Comme précédemment, deux concentrations en éthanol ont été testées lors des chocs : 10 et 14% (v/v).

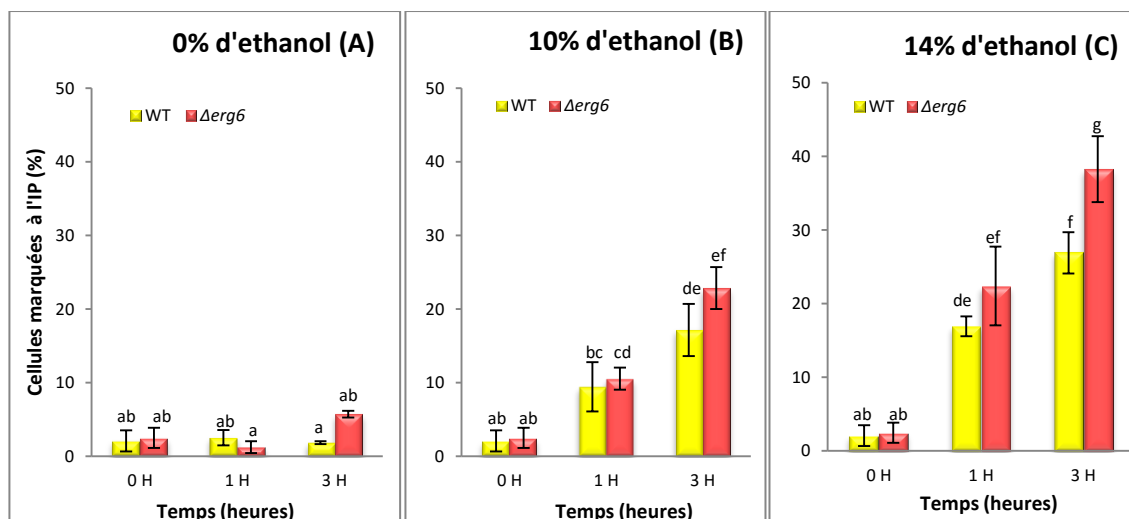


Figure 26 : Evolution des pourcentages de cellules perméabilisées (marquées par l'IP) pour les souches WT et $\Delta erg6$ au cours d'un choc éthanol à 0% (A-témoin), 10% (B) et 14% (C). Cultures menées sous agitation. Chocs réalisés dans une solution binaire : eau-glycérol. Les valeurs sont une moyenne de trois répétitions biologiques. Le test de significativité est réalisé par une ANOVA ($P \leq 0,05$) à un facteur. Les valeurs dotées de mêmes lettres ne sont pas significativement différentes suivant le test Student t .

Les résultats présentés dans la Figure 26 montrent que les levures présentent une très faible proportion de cellules perméabilisées (de 2 à 6%) en l'absence d'éthanol pour les souches WT et $\Delta erg6$ pendant 3 heures.

Au bout d'une heure de traitement à 10% d'éthanol, les pourcentages de cellules perméabilisées sont de 9,4% et 10,5%, respectivement pour les souches WT et $\Delta erg6$. Après trois heures de traitement, ces taux atteignent 17,1% et 22,8%, respectivement. Les différences entre les souches ne sont cependant pas significatives. Il en est de même pour le traitement d'une heure à 14% d'éthanol avec des valeurs de 16,9% et 22,4% de cellules perméabilisées. Cependant, après 3 heures de traitement, nous avons trouvé une différence significative entre les valeurs de pourcentages de cellules perméabilisées avec 26,9% et 38,3%, respectivement pour les souches WT et $\Delta erg6$.

Concernant l'évolution de la viabilité des levures (Fig. 27), en l'absence d'éthanol et après d'une heure de traitement, le taux de viabilité des cellules est d'environ 92% et au bout de 3 heures, de 86% pour les deux souches.

A 10% d'éthanol, au bout d'une heure, on a environ 89% de survie pour la souche WT et environ 83% pour le mutant $\Delta erg6$. Au bout de 3 heures, des valeurs de 66% et 67% de survie sont obtenues respectivement pour la souche WT et $\Delta erg6$.

Pour le traitement à 14% d'éthanol, les taux de viabilité obtenus sont d'environ 77% et de 74% après 1 heure et de 54% et 43% après 3 heures, respectivement pour les souches WT et $\Delta erg6$.

Il n'y a pas de différence significative entre la souche WT et le mutant $\Delta erg6$.

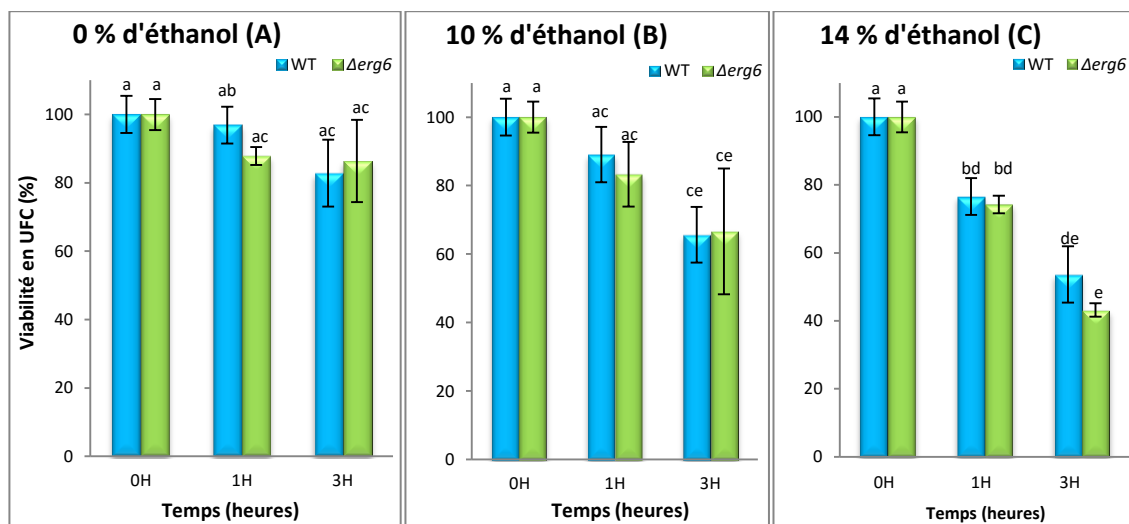


Figure 27 : Evolution de la viabilité des levures (méthode UFC) exprimée en pourcentage au cours d'un choc éthanol à 0% (A-témoin), 10% (B) et 14% (C) - 100% correspond à la population initiale (10^6 cellules/mL). Cultures menées sous agitation. Chocs réalisés dans une solution binaire : eau-glycérol. Les valeurs sont une moyenne de trois répétitions biologiques. Le test de significativité est réalisé par une ANOVA ($P \leq 0,05$) à un facteur. Les valeurs dotées de mêmes lettres ne sont pas significativement différentes suivant le test Student *t*.

1.3.1.3. Discussion

La comparaison des données entre cultures agitées et non agitées met en évidence une plus forte résistance de la souche WT, lors des chocs à 14%, avec une chute d'environ 10% de cellules altérées à 1 heure et 3 heures de traitement sur cellules cultivées sous agitation. La survie cellulaire de la souche sauvage est également améliorée avec 54% de cellules viables après 3 heures à 14% d'éthanol contre 37% sur cellules cultivées en condition statique et traitées de la même manière. Dans les conditions de culture statique, l'oxygène dissous est moins important en comparaison à une culture agitée. Or, l'oxygène est un élément indispensable à la synthèse des stérols chez les levures (Shobayashi *et al.*, 2007). Il est ainsi probable que la limitation en oxygène conduise à une synthèse de stérols différents (précurseurs de l'ergostérol) ou à des quantités d'ergostérol inférieures chez la souche

sauvage dans le cas de la culture statique. Cette hypothèse pourrait expliquer la plus forte résistance des levures cultivées sous agitation par rapport aux cellules cultivées de manière statique.

Bien qu'il apparait une tendance à une meilleure résistance à l'éthanol chez la souche WT, comparée au mutant $\Delta erg6$, les concentrations en éthanol mises en œuvre n'ont pas permis de trouver des conditions réellement discriminantes, permettant d'obtenir des différences significatives entre les deux souches. Nous avons donc testé des concentrations en éthanol plus fortes (16, 18, 20, 30 et 40% v/v) avec un temps d'exposition d'une heure sur cellules cultivées sous agitation (pas de limitation en oxygène).

1.3.2. Effet de chocs éthanol à 16, 18, 20, 30 et 40% v/v sur la viabilité et sur l'intégrité membranaire

Le marquage des levures à l'IP réalisé après les différents traitements (Fig.28 A, B, C, D, E et F) montre l'impact de l'éthanol à différentes concentrations sur l'intégrité de la membrane des souches.

En l'absence d'éthanol (témoins), une très forte proportion des cellules reste intègre avec un maximum de 5% de cellules perméabilisées après 1 heure d'incubation.

Après 1 heure d'incubation en présence de 16% d'éthanol, on obtient un taux de perméabilisation de 26,1 % pour le WT et de 35,6 % pour la souche $\Delta erg6$. Ce taux est de 37,8 % pour le WT et de 66,3 % pour la souche $\Delta erg6$, en présence de 18% d'éthanol. L'incubation de 1 heure à 20% d'éthanol entraîne des taux de perméabilisation de 61,2 % et 88,5 % pour les souches WT et $\Delta erg6$, respectivement. A partir d'une concentration de 30% d'éthanol, les taux de perméabilisation de deux souches avoisinent 100% après 1 heure d'incubation. Par contre, pour les concentrations inférieures testées, la souche WT est significativement moins affectée que la souche mutante.

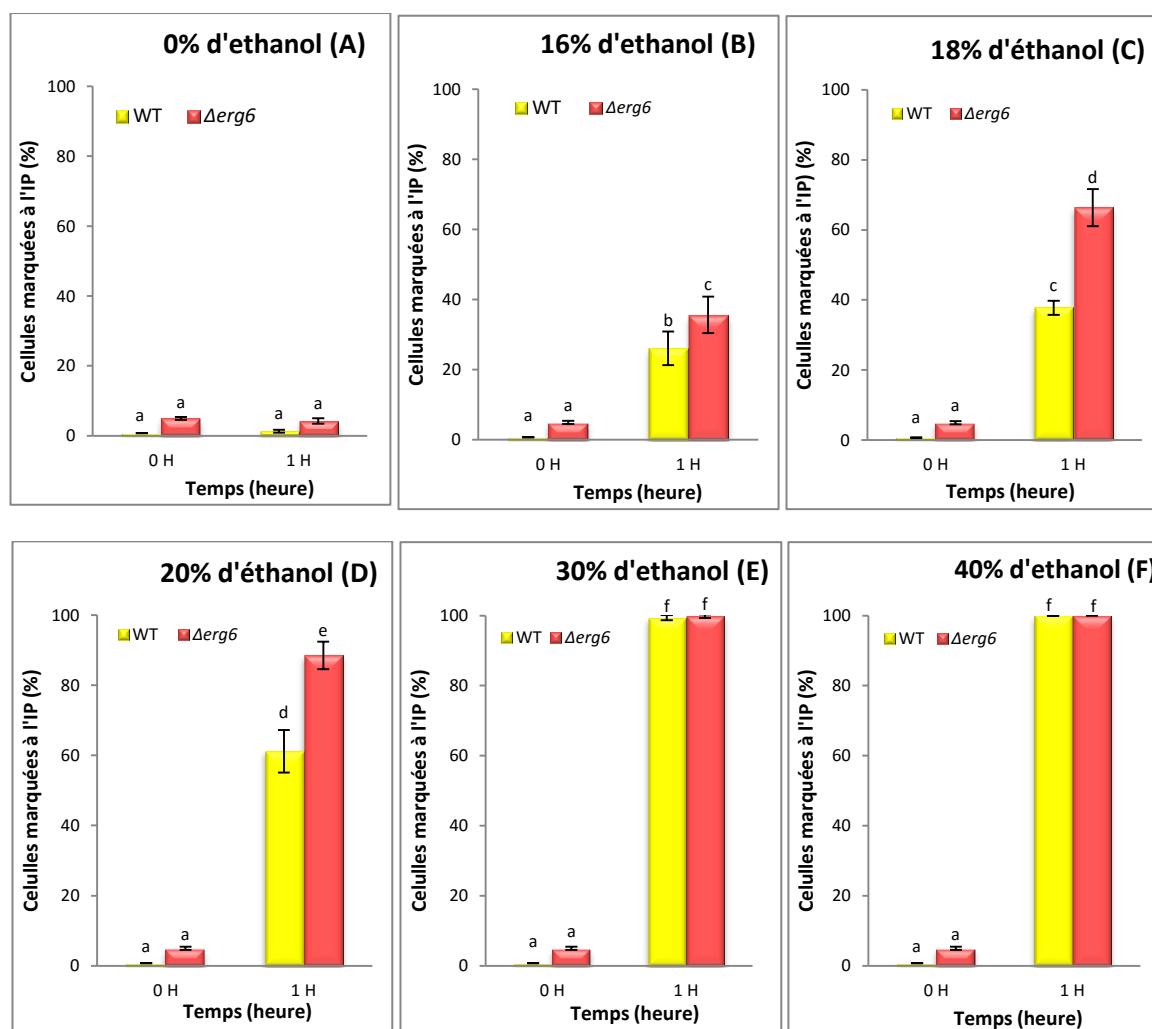


Figure 28 : Evolution du pourcentage de cellules perméabilisées (marquées par l'IP) pour les souches WT et $\Delta erg6$ au cours d'un choc éthanol à 0% (A-témoin) ; 16% (B) ; 18% (C) ; 20% (D) ; 30% (E) et 40% (F). Cultures menées sous agitation. Chocs réalisés dans une solution binaire : eau-glycérol. Les valeurs sont une moyenne de trois répétitions biologiques. Le test de significativité est réalisé par une ANOVA ($P \leq 0,05$)   un facteur. Les valeurs dotées de mêmes lettres ne sont pas significativement différentes suivant le test Student t .

Concernant l'évolution de la viabilité des levures, en l'absence d'éthanol et après une heure de traitement, le taux de viabilité des cellules est d'environ de 95% et de 92% (Fig. 29), avec des valeurs de viabilité mesurées de $6,8.10^5$ UFC/mL et de $6,3.10^5$ UFC/mL (Tableau 8), respectivement pour la souche WT et le mutant $\Delta erg6$.

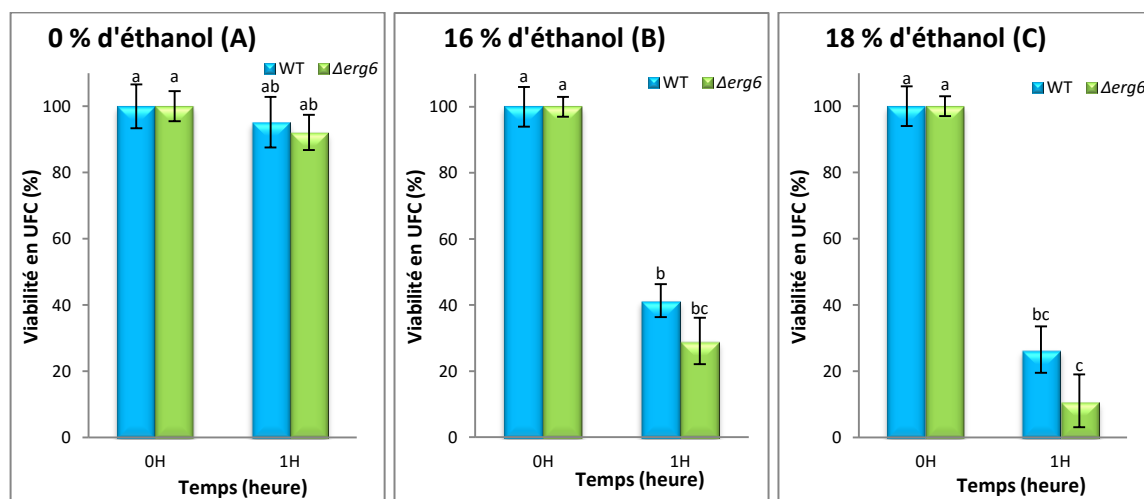


Figure 29 : Viabilité des levures (méthode UFC) exprimée en pourcentage après 60 minutes d'incubation en présence de 0% (A-témoin), 16% d'éthanol (B) et 18% d'éthanol (C). Cultures menées sous agitation. Chocs réalisés dans une solution binaire : eau-glycérol. Les valeurs sont une moyenne de trois répétitions biologiques. Le test de significativité est réalisé par une ANOVA ($P \leq 0,05$) à un facteur. Les valeurs dotées de mêmes lettres ne sont pas significativement différentes suivant le test Student *t*.

En présence d'éthanol, on mesure une chute de viabilité non significativement différente entre les deux souches, respectivement de l'ordre de 35% pour 16% d'éthanol (Fig. 29B) et de l'ordre de 19% pour 18% d'éthanol (Fig. 29C).

Tableau 8 : Viabilité des souches WT et $\Delta erg6$ (méthode UFC) exprimée en log après une heure d'incubation en présence de 0, 20, 30 et 40% d'éthanol. Cultures menées sous agitation. Chocs réalisés dans une solution binaire : eau-glycérol.

Temps (heure) [EtOH]	0H		1H	
	Souche WT	Souche $\Delta erg6$	Souche WT	Souche $\Delta erg6$
0%	$5,95 \pm 0,03^a$	$5,90 \pm 0,01^a$	$5,83 \pm 0,03^a$	$5,80 \pm 0,02^a$
20%			$3,80 \pm 0,08^b$	$2,75 \pm 0,16^c$
30%			$0,75 \pm 0,39^d$	$0,53 \pm 0,17^d$
40%			1 ou 2 colonies après 4 jours d'incubation en boîte de Pétri	

Les valeurs sont une moyenne de trois répétitions biologiques. Le test de significativité est réalisé par une ANOVA ($P \leq 0,05$) à un facteur. Les valeurs dotées de mêmes lettres ne sont pas significativement différentes suivant le test Student *t*.

En présence de 20% d'éthanol, après 60 minutes de traitement, les valeurs de viabilité mesurées chutent de façon drastique pour la souche WT avec $6,4.10^3$ UFC/mL et, pour la souche mutante, $5,9.10^2$ UFC/mL (Tableau 8). Les différences de populations mesurées entre les deux souches sont significativement différentes. Cependant, lorsque la concentration testée est supérieure ou égale à 30% d'éthanol, on ne trouve pas de différence significative entre les deux souches, avec des valeurs de viabilité obtenues très faibles, de l'ordre de 6.10^5 UFC/mL.

1.4. Discussion

Les objectifs des travaux réalisés dans ce premier chapitre étaient, dans un premier temps, de trouver des conditions d'application d'un stress éthanol permettant de discriminer les différentes souches utilisées, en fonction de leur mutation dans la voie de biosynthèse de l'ergostérol. La présence d'ergostérol dans les membranes levuriennes est reconnue comme indispensable à une bonne production et tolérance à l'éthanol chez les levures œnologiques (Henderson *et al.*, 2013). Ceci se concrétise, en pratique de vinification, par le soin de vérifier la présence d'une teneur optimale en oxygène dissous pendant tout le déroulement de la fermentation alcoolique (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). La levure modèle utilisée ici (levure de laboratoire) ne possède qu'une très faible activité fermentaire, ce qui ne nous a pas permis de pousser plus loin notre investigation. Nous pourrions envisager dans l'avenir de générer

nos propres mutants, affectés dans la voie de biosynthèse de l'ergostérol, à partir d'une levure œnologique. Ceci nous permettrait d'étudier le lien entre la nature des principaux stérols présents dans les membranes levuriennes et l'alcool-tolérance des levures destinées aux fermentations alcooliques. Nous avons donc choisi de cultiver les souches levuriennes sur milieu Malt Wickerham modifié en présence d'éthanol exogène, tel que dans de nombreuses études référencées (Beaven *et al.*, 1982 ; Henderson *et al.*, 2013 ; Henderson *et al.*, 2014). Dans ces nouvelles conditions, l'apport d'oxygène au cours de la culture en présence d'éthanol est indispensable afin de s'assurer des conditions optimales de synthèse de l'ergostérol chez la souche Wild type, témoin de nos expérimentations. Une seule souche mutante a été retenue pour la suite de l'étude, il s'agit du mutant $\Delta erg6$ pour étudier de façon plus approfondie les événements membranaires conduisant à la survie ou à la mort des levures lors de perturbations éthanoliques. L'effet direct de l'éthanol sur la membrane est analysé par l'évolution des pourcentages de cellules perméabilisées (marquées par l'IP), en corrélation avec l'évaluation « classique » de la viabilité, par la méthode UFC.

Le contact de l'éthanol avec les cellules entraîne une perméabilisation mesurable pour une concentration en éthanol supérieure à 10% v/v. L'effet perméabilisant est d'autant plus fort que la concentration en éthanol est élevée (Fig. 28). Cet effet est probablement lié au pouvoir fluidifiant de l'éthanol, largement décrit dans la littérature (Swan & Watson, 1997, 1999 ; Dinh *et al.*, 2008 ; Ding *et al.*, 2009), conduisant à l'altération du rôle de barrière de la membrane plasmique. Mais, les résultats obtenus démontrent que la nature des stérols membranaires influe sur cet effet puisque la souche sauvage présente une proportion de cellules intègres plus importante que la souche $\Delta erg6$ après un choc à 20% de 60 min (Fig. 28). La viabilité est, de plus, significativement différente entre la souche témoin WT et la souche $\Delta erg6$, après 60 minutes d'incubation (Tableau 8). Cependant, il semblerait que, pour des concentrations plus élevées en éthanol, la nature des stérols n'ait plus d'influence, puisque il n'y a plus de différence significative, après 1 heure de traitement à 30% d'éthanol, entre les deux souches. Les résultats présentés dans la Figure 28 et le Tableau 8 permettent d'émettre des hypothèses sur les mécanismes membranaires conduisant à une perte très importante d'intégrité de la membrane plasmique et, de ce fait, une perte importante de viabilité. La membrane, gravement endommagée par l'amplitude du stress éthanol ne peut être « protégée » par l'action du stérol, conduisant vraisemblablement à la rupture et à la déformation particulière de la membrane plasmique.

Ces premiers résultats nous permettent de déterminer les conditions d'application de stress

éthanol conduisant à la mort ou à la survie des levures. Ils mettent également en évidence l'existence d'une corrélation, pour les concentrations en éthanol testées, entre le pourcentage de cellules perméabilisées et le pourcentage de mortalité cellulaire, suggérant que l'éthanol induit de façon indirecte une mortalité cellulaire, qui serait dépendante de la nature des stérols membranaires. En effet, la souche sauvage WT présente une proportion de cellules intègres plus importante que la souche *Δerg6* après un choc à 20% de 60 minutes.

Afin de mieux appréhender l'effet direct et indirect de l'éthanol sur la membrane plasmique, nous avons élaboré une stratégie originale, consistant à appliquer de façon limitée dans le temps le stress éthanolique. Une seule concentration a été retenue dans la poursuite de notre étude : 20% d'éthanol.

CHAPITRE II : EFFET D'UN CHOC ETHANOL 20% V/V – COMPARAISON SOUCHE WILD TYPE ET SOUCHE *ΔERG6*

Un choc éthanol à 20%, suivi d'une incubation sur un temps de 60 minutes, conduit à des taux de survies entre les deux souches WT et *Δerg6* significativement différents. Ce chapitre vise à expliquer les différences observées. Pour cela, différentes stratégies ont été développées. Afin de comparer l'effet direct de l'éthanol sur les membranes plasmiques chez les deux souches, l'évolution de la perméabilisation de la membrane a été évaluée au cours du temps d'incubation par cytométrie sur cellules marquées à l'IP. Nous avons également quantifié l'évolution de la fluidité membranaire, par mesure d'anisotropie de fluorescence avec marquage au TMA-DPH. L'effet indirect de l'éthanol a été plus précisément analysé en appliquant chez les deux souches le choc éthanol sous forme de « pulse » (20% v/v d'éthanol – 15 minutes). Dans de telles conditions d'application du stress éthanol, notre étude s'est achevée par la quantification *via* l'analyse transcriptomique des niveaux de transcription des principaux gènes marqueurs d'oxydation.

2.1. Effet d'un choc éthanol à 20% sur la viabilité et sur l'intégrité membranaire

2.1.1. Effet direct d'un choc éthanol à 20% pendant 60 minutes

Afin de mieux appréhender la cinétique de mortalité des cellules lors d'un choc éthanol à forte concentration, nous avons étudié l'évolution de l'intégrité de la membrane au cours du temps (0, 15, 30 et 60 min) suite au choc éthanol à 20% (protocole schématisé en Fig. 30). Parallèlement, nous avons également effectué, pour les mêmes conditions, des mesures de viabilité. Les cellules sont cultivées sous agitation avant l'application des chocs.

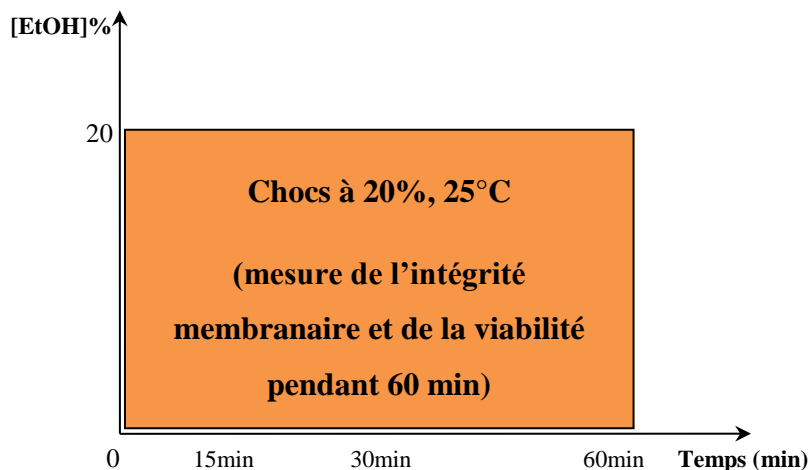


Figure 30 : Schéma du protocole utilisé afin d'étudier l'évolution de l'intégrité membranaire et de la viabilité au cours du temps après un choc éthanol à 20% pendant 60 minutes.

2.1.1.1. Cinétique de perméabilisation membranaire lors d'un choc éthanol à 20% pendant 60 minutes

L'évolution de la perméabilité de la membrane plasmique des levures au cours de l'incubation est mesurée par cytométrie après marquage à l'Iodure de Propidium (IP). Les résultats sont issus au minimum de trois répétitions biologiques.

La Figure 31 (A et B) présente l'évolution des taux de cellules perméabilisées, après le choc et au cours de l'incubation en présence de 20% d'éthanol, des souches WT et $\Delta erg6$ préalablement cultivées sous agitation.

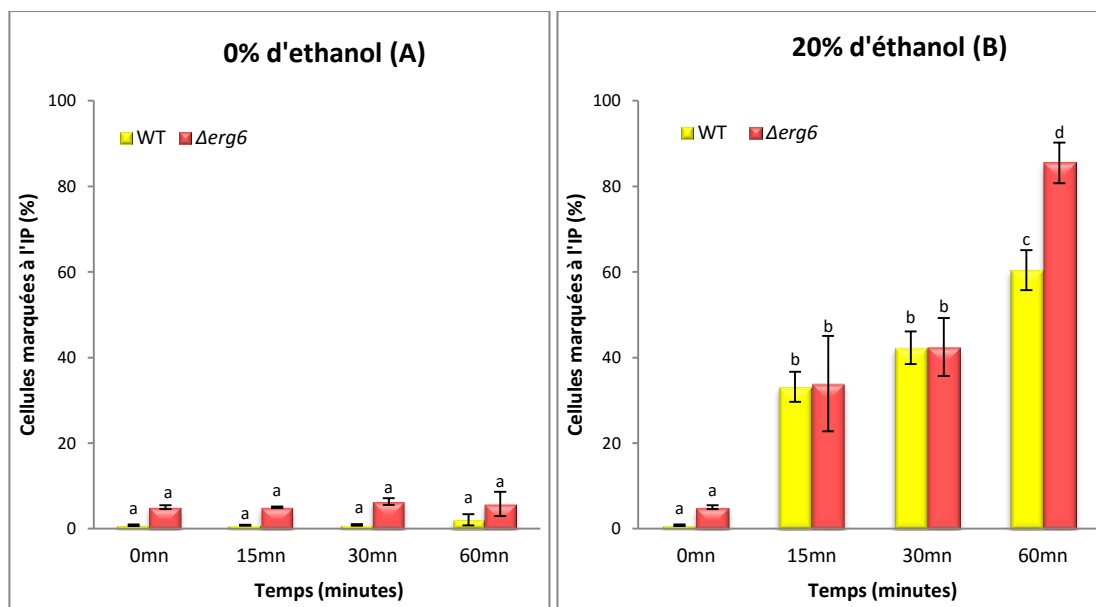


Figure 31 : Evolution au cours du temps des pourcentages de cellules perméabilisées (marquées par l'IP) pour les souches WT et $\Delta erg6$ au cours d'un choc éthanol à 0% (A) et 20% (B). Les valeurs sont une moyenne de trois répétitions biologiques. Le test de significativité est réalisé par une ANOVA ($P \leq 0,05$)   un facteur. Les valeurs dotées de mêmes lettres ne sont pas significativement différentes suivant le test Student *t*.

En l'absence d'éthanol, les levures présentent une très faible proportion de cellules perméabilisées, environ de 1 à 6% pour les souches WT et $\Delta erg6$, pendant 60 minutes.

Après quinze minutes de traitement en présence de 20% d'éthanol, les pourcentages de cellules perméabilisées sont de l'ordre de 32% chez les deux souches et n'évoluent pas significativement après 30 minutes d'incubation. En revanche, à partir de 60 minutes de traitement, les valeurs obtenues augmentent de façon drastique, avec respectivement 60,4% et 85,5% de cellules perméabilisées pour la souche WT et le mutant $\Delta erg6$.

2.1.1.2. Mesure de la mortalité induite par le choc éthanol à 20% après 60 minutes

La Figure 32 présente les viabilités des souches WT et $\Delta erg6$ mesurées par méthode UFC après 30 et 60 minutes d'incubation en présence de 20% d'éthanol.

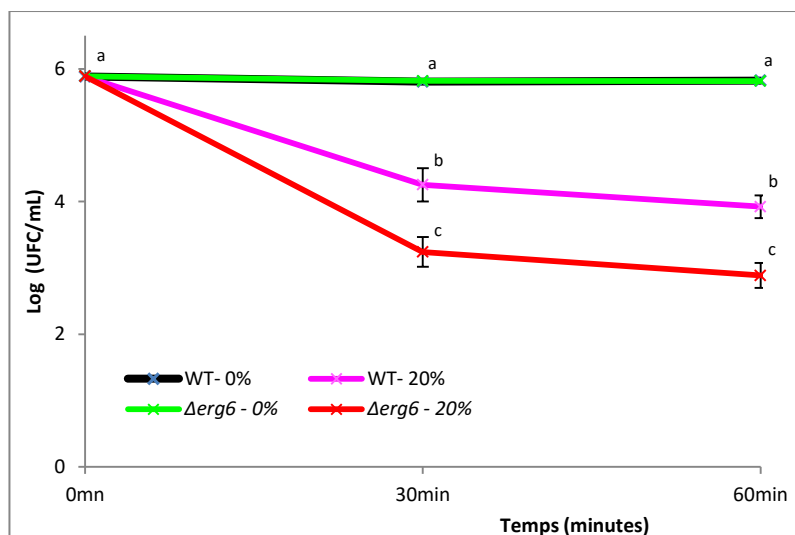


Figure 32 : Viabilité des levures après 30 et 60 minutes d'incubation en présence de 0% (A) et 20% d'éthanol (B). Les valeurs sont une moyenne de trois répétitions biologiques. Le test de significativité est réalisé par une ANOVA ($P \leq 0,05$) à un facteur. Les valeurs dotées de mêmes lettres ne sont pas significativement différentes suivant le test Student *t*.

Les résultats présentés dans la Figure 32 montrent des différences de populations mesurées entre les deux souches significativement différentes à 30 min et 60 min. Après 30 minutes de traitement, les valeurs de viabilité mesurées chutent de façon drastique pour la souche WT avec $2,0 \cdot 10^4$ UFC/mL et, pour la souche mutante, $1,5 \cdot 10^3$ UFC/mL. Après 60 min d'incubation, on dénombre chez la souche WT $6,4 \cdot 10^3$ UFC/mL et chez le mutant $\Delta erg6$, $5,9 \cdot 10^2$ UFC/mL.

La prolongation de l'incubation de 30 à 60 minutes n'altère pas de façon significative la viabilité des deux souches.

2.1.1.3. Effet direct du choc éthanol sur la fluidité membranaire

Afin de mieux appréhender l'effet instantané de l'éthanol sur la fluidité membranaire des deux souches, nous avons étudié l'évolution de la fluidité de la membrane au cours du temps (0, 15, 30 et 60 min) suite à un choc réalisé directement sur les cellules après incorporation de la sonde TMA-DPH. Plus précisément, après culture, récolte et lavage des cellules, nous ajoutons 1 μ L de la solution 10 mM TMA-DPH dans 2,4 mL de suspension cellulaire à une DO_{600} de 0,6. Après 30 min d'attente jusqu'à stabilisation du signal, 0,6 mL d'éthanol pur

sont ajoutés dans la cuve afin d'obtenir une concentration finale de 20% (v/v) et une DO_{600} finale de 0,5. La concentration finale de TMA-DPH est de 3,3 μM . Les concentrations de TMA-DPH citées dans la bibliographie sont comprises entre 0,5 et 5 μM (Sharma 2006 ; Abe et Hiraki 2009). L'évolution de la fluidité membranaire est suivie au cours du temps. Les valeurs d'anisotropie calculées sont relevées toutes les 8 secondes pendant 10 min après 30 minutes de stabilisation du signal. Le protocole utilisé est schématisé Figure 33. Les résultats obtenus sont présentés Figure 34.

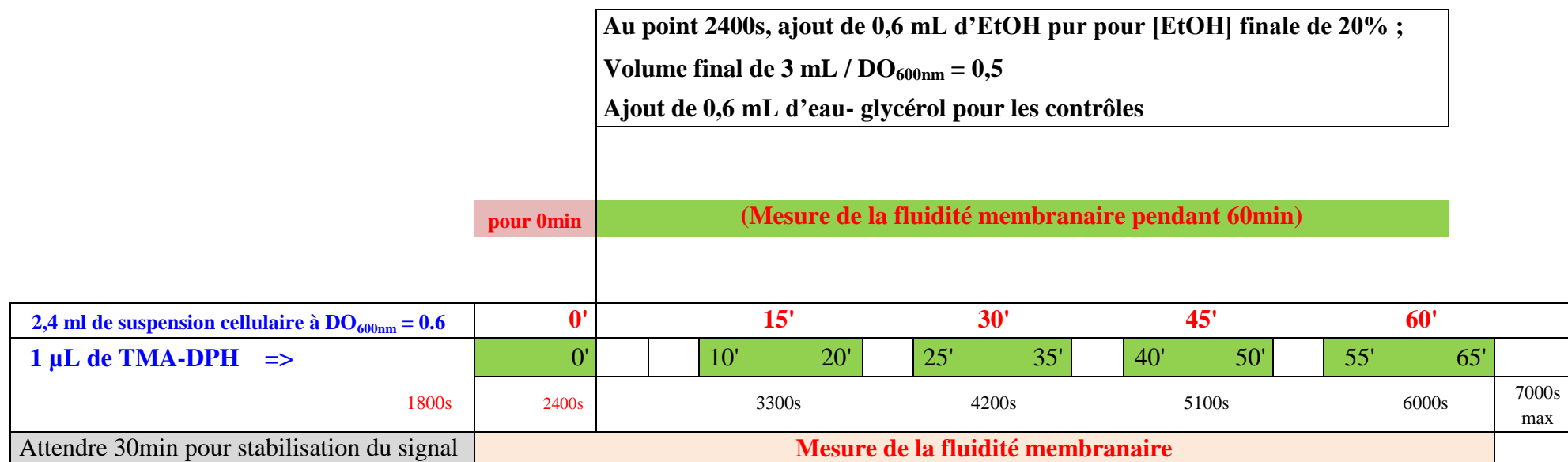


Figure 33 : Schéma du protocole utilisé pour étudier l'évolution de la fluidité membranaire suite à un choc éthanol à 20% v/v. T° maintenue à 25°C.

(') : minute, (s) : seconde

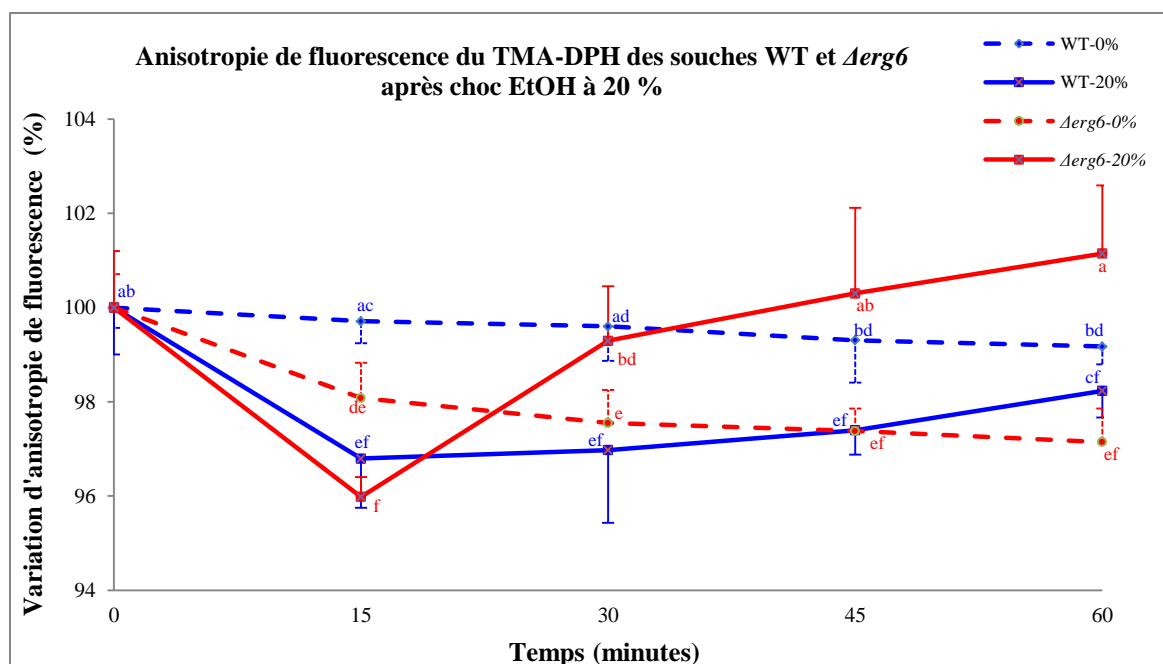


Figure 34 : Evolution au cours du temps de la fluidité membranaire pour les souches WT et $\Delta erg6$ suite à un choc éthanol 20%. Variations exprimées en % par rapport à la valeur initiale d'anisotropie. Les valeurs initiales d'anisotropie sont de 0,284 et 0,263 pour les souches WT et $\Delta erg6$, respectivement. Les valeurs sont une moyenne de trois répétitions biologiques. Le test de significativité est réalisé par une ANOVA ($P \leq 0,05$) à un facteur. Les valeurs dotées de mêmes lettres ne sont pas significativement différentes suivant le test Student t .

Les valeurs témoins d'anisotropie pour les deux souches obtenues à 25°C sont respectivement de 0,284 et 0,263. Ces valeurs sont cohérentes avec celles déjà obtenues dans la bibliographie (Sharma, 2006; Abe et Hiraki, 2009) et mettent en évidence une membrane initialement plus fluide chez le mutant $\Delta erg6$.

En absence d'éthanol, la fluidité reste relativement stable au cours du temps chez la souche sauvage. Par contre, il est observé une fluidification progressive de la membrane de la souche $\Delta erg6$, avec une chute de 3% de la valeur initiale d'anisotropie après 60 minutes d'incubation (Fig. 34). Après ajout de l'éthanol, on observe à 15 minutes une fluidification des membranes. Cependant, les variations d'anisotropie sont comparables chez les deux souches. Ceci suggère que l'effet fluidifiant instantané de l'éthanol ne dépend pas de la nature des stérols présents dans la membrane. Après 15 minutes, pour la souche WT, le niveau de fluidité membranaire reste stable jusqu'à 60 minutes d'incubation. Chez la souche $\Delta erg6$, une rigidification est observée après 15 minutes, avec une valeur d'anisotropie comparable à la valeur initiale obtenue dès la 30^{ème} minute d'incubation.

2.1.2. Effet indirect du choc éthanol appliqué sous forme de « pulse » (20% v/v d'éthanol – 15 minutes)

Afin de comprendre le mécanisme par lequel l'éthanol affecte l'intégrité de la membrane plasmique des deux souches, nous avons réalisé le choc éthanol sur une durée de 15 minutes et avons ensuite suivi l'évolution de l'intégrité membranaire au cours du temps après retour dans un milieu sans éthanol. Le suivi de l'évolution de l'intégrité membranaire et de la viabilité a été prolongé sur une durée totale de 3 heures après retour dans un milieu sans éthanol (tampon-glycérolé). Le protocole utilisé est schématisé dans la Figure 35.

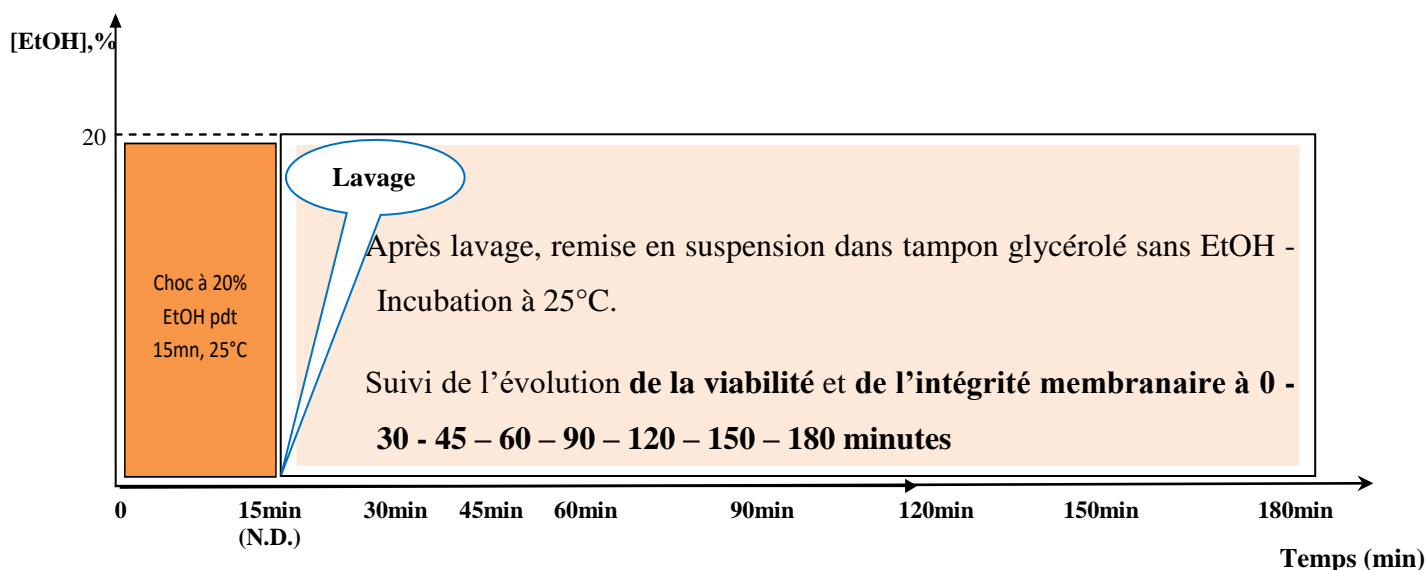


Figure 35 : Schéma du protocole mis en œuvre pour le suivi de l'évolution de l'intégrité membranaire et de la viabilité au cours du temps après un choc éthanol à 20% v/v pendant 15 minutes. (N.D. : Non déterminé)

2.1.2.1. Effet d'un choc éthanol à 20% pendant 15 minutes (« pulse ») sur l'intégrité membranaire – suivi pendant 3 heures

La Figure 36 (A et B) présente l'évolution du taux de cellules perméabilisées chez les souches WT et $\Delta erg6$, soumises au « pulse éthanol ». Les levures sont préalablement cultivées sous agitation avant application du choc.

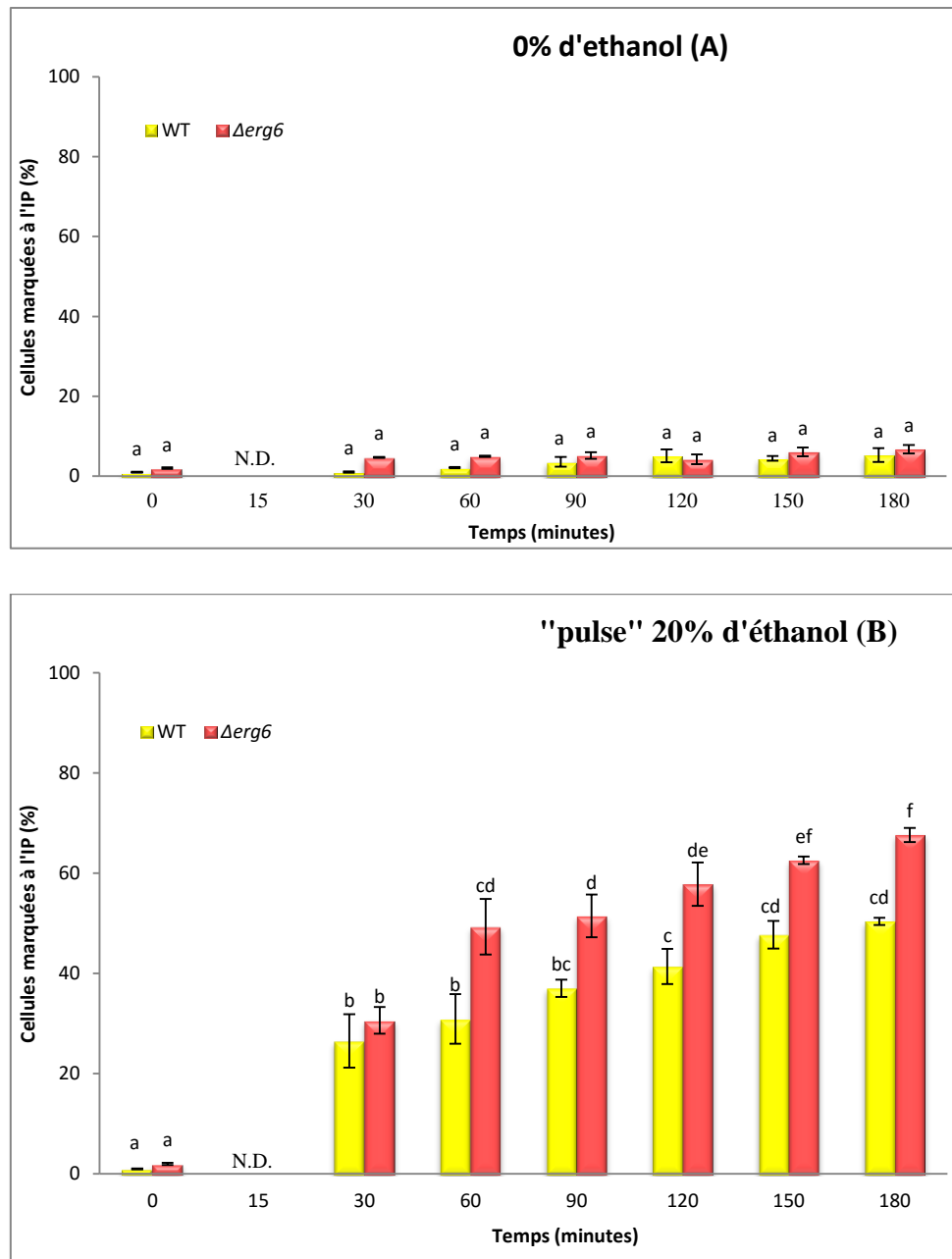


Figure 36 : Evolution des pourcentages de cellules perméabilisées (marquées par l'IP) pour les souches WT et $\Delta erg6$ sans choc éthanol (A) et après un choc éthanol à 20% de 15 min puis retour à une condition sans éthanol (B). (N.D. : Non Déterminé). Les valeurs sont une moyenne de trois répétitions biologiques. Le test de significativité est réalisé par une ANOVA ($P \leq 0,05$) à un facteur. Les valeurs dotées de mêmes lettres ne sont pas significativement différentes suivant le test Student *t*.

En l'absence d'éthanol, les levures présentent une très faible proportion de cellules perméabilisées, environ de 1 à 6% pour les souches WT et $\Delta erg6$ pendant les 180 minutes d'expérience (Fig. 36A).

Après le choc éthanol (Fig. 36B), au point 30 min (15 min dans l'éthanol 20% + 15 min dans

un milieu sans éthanol), la proportion de cellules perméabilisées n'est pas significativement différente entre les deux souches, avec des valeurs de 26,5% et 30,6% pour la souche WT et la souche $\Delta erg6$ respectivement. En revanche, à partir du point 60 min et jusqu'au point 180 min, les différences entre les deux souches sont significatives. A 60 minutes, comme précédemment observé, le taux de cellules perméabilisées est significativement plus faible pour la souche WT. La prolongation de l'incubation entraîne dans les deux cas une augmentation similaire du taux de cellules altérées, avec chez la souche mutante $\Delta erg6$ des taux d'altération supérieurs d'environ 20% par rapport à la souche sauvage. Ainsi, ces résultats montrent que la différence de l'effet perméabilisant de l'éthanol, en fonction de la nature des stérols présents dans la membrane est significative entre la 15^{ème} et la 30^{ème} minute d'incubation, après retrait de l'éthanol du milieu. La prolongation de l'incubation entraîne une même cinétique d'altération membranaire chez les deux souches étudiées.

2.1.2.2. Effet d'un choc éthanol à 20% pendant 15 minutes (« pulse ») sur la viabilité membranaire – suivi pendant 3 heures

La Figure 37 présente les viabilités cellulaires des souches WT et $\Delta erg6$ mesurées par méthode UFC.

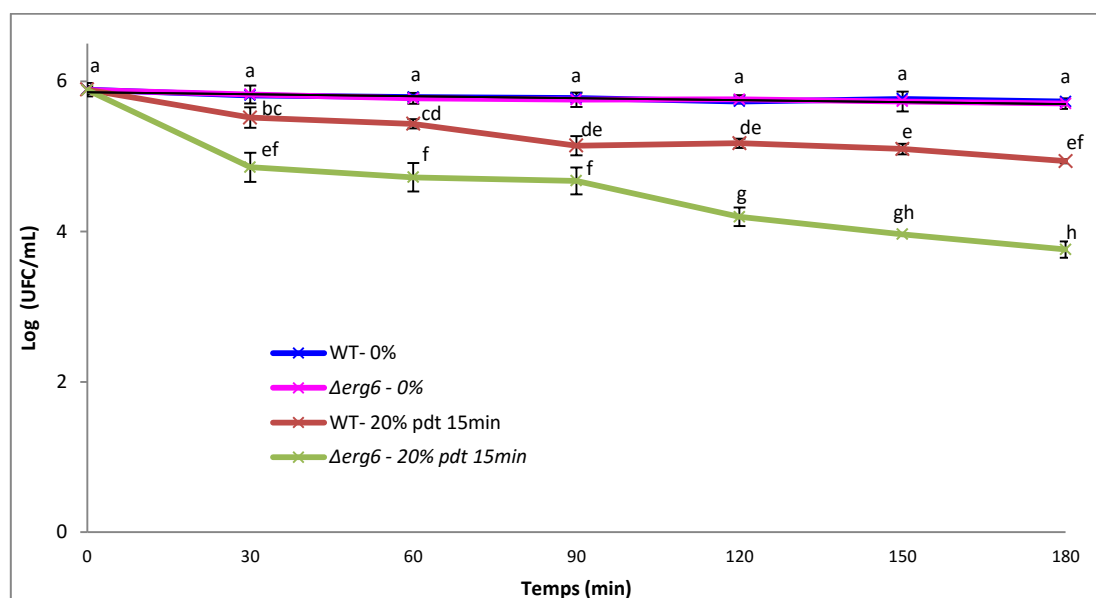


Figure 37 : Viabilité des levures (méthode UFC) pour les souches WT et $\Delta erg6$ sans choc éthanol (0%) et après un choc éthanol à 20% - 15 min puis retour à une condition sans éthanol. Les valeurs sont une moyenne de trois répétitions biologiques. Le test de significativité est réalisé par une ANOVA ($P \leq 0,05$) à un facteur. Les valeurs dotées de mêmes lettres ne sont pas significativement différentes suivant le test Student *t*.

La viabilité des cellules se maintient après 3 heures d'incubation, en l'absence d'éthanol. Il n'y a pas de différence significative entre la souche WT et le mutant *Δerg6*.

Après choc éthanol, puis retour à une condition sans éthanol, les différences de populations mesurées entre les deux souches sont significativement différentes. Au point 30 minutes de traitement, les valeurs de viabilité mesurées chutent pour la souche WT avec $3,4 \cdot 10^5$ UFC/mL et pour la souche mutante *Δerg6*, $7,7 \cdot 10^4$ UFC/mL, alors qu'aucune différence significative n'a été observée précédemment sur les taux de cellules altérées. La prolongation de l'incubation n'altère pas de façon significative la viabilité de la souche WT, alors qu'une chute est observée chez le mutant à partir de 120 minutes. Après 180 minutes, les niveaux de population sont de $5,9 \cdot 10^3$ UFC/mL pour la souche *Δerg6*, contre $8,7 \cdot 10^4$ UFC/mL pour la souche sauvage.

2.1.2.3. Effet indirect du stress éthanol appliqué sous forme de « Pulse » (20% v/v d'éthanol – 15 minutes) sur la fluidité membranaire

Le schéma du protocole utilisé afin d'étudier l'évolution de la fluidité membranaire au cours du temps après un choc éthanol à 20% pendant 15 minutes est présenté Figure 38. Nous avons procédé comme suit : suite au choc éthanol à 20% pendant 15 min, les cellules sont lavées et remises en suspension dans du tampon- glycérolé de manière à obtenir une densité optique à 600 nm (DO_{600}) de 0,5. On ajoute ensuite 1 μ L de la solution 10 mM TMA-DPH dans 3 mL de suspension cellulaire de manière à obtenir une concentration finale de 3,3 μ M. La réalisation des mesures d'anisotropie de fluorescence induite par le choc à éthanol appliqué sous forme de « Pulse » est conduite de la même façon que précédemment. Les résultats obtenus sont présentés Figure 39.

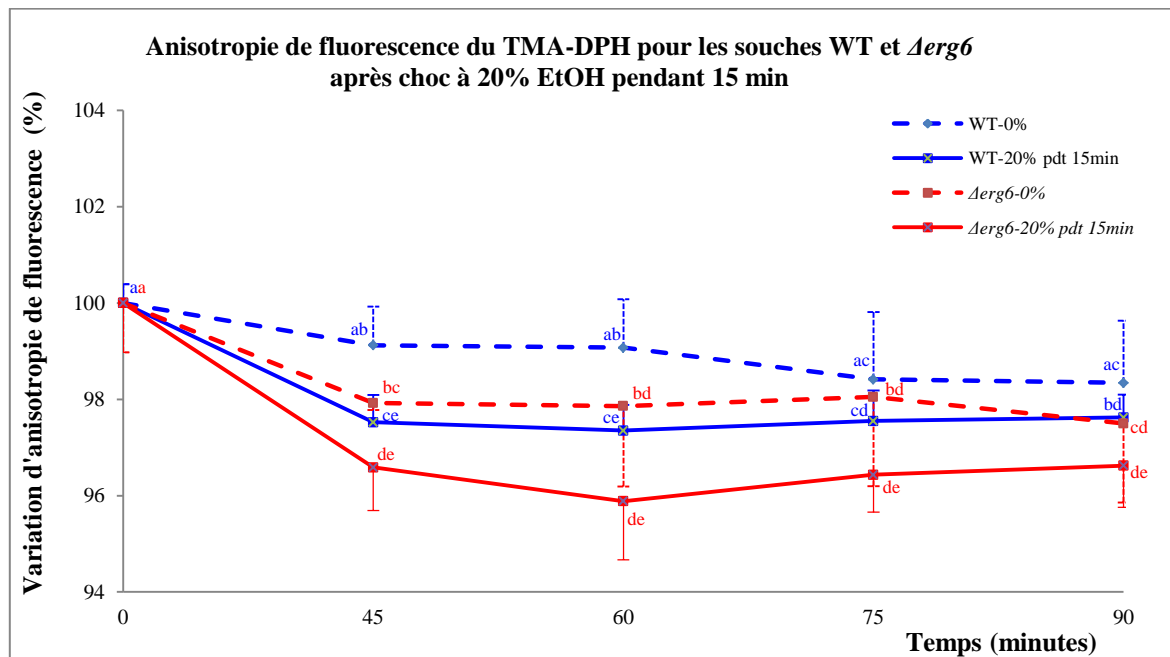
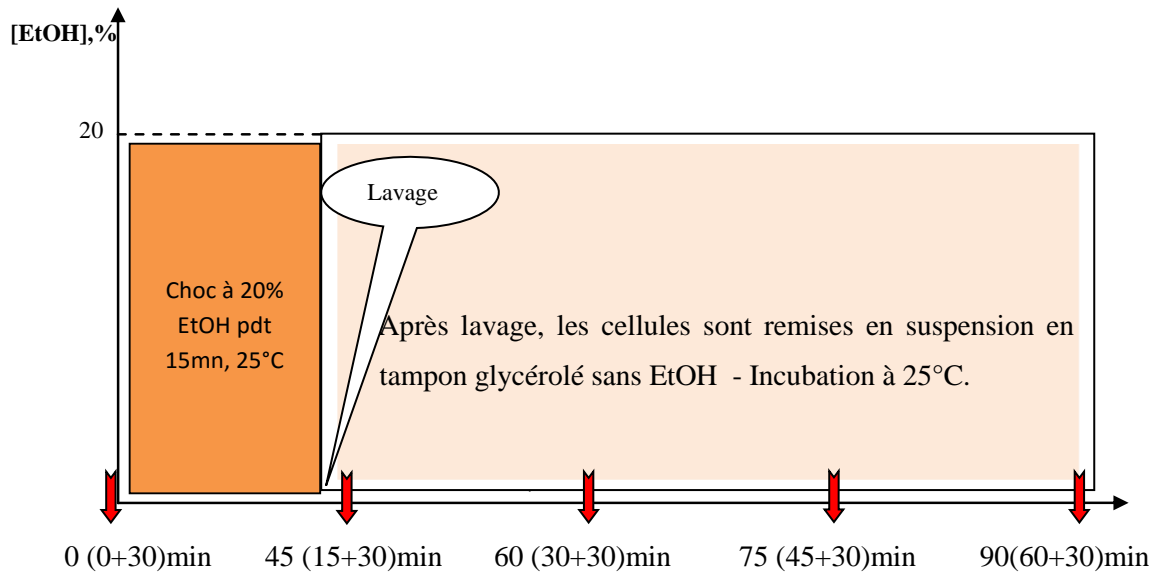


Figure 39 : Evolution des fluidités membranaires (anisotropie de fluorescence) pour les souches WT et $\Delta erg6$ sans choc éthanol (0%) et après un choc éthanol à 20% de 15 min puis retour à une condition sans éthanol. Les variations d'anisotropie sont exprimées en % par rapport aux valeurs initiales. Les valeurs initiales d'anisotropie sont de 0,284 et 0,263 pour les souches WT et $\Delta erg6$, respectivement. Les valeurs sont une moyenne de trois répétitions biologiques. Le test de significativité est réalisé par une ANOVA ($P \leq 0,05$) à un facteur. Les valeurs dotées de mêmes lettres ne sont pas significativement différentes suivant le test Student t .

Les membranes cellulaires de la souche WT maintiennent leur fluidité en l'absence d'éthanol (Fig. 39). En revanche, après le choc éthanol, la membrane apparaît plus fluide dès la 45^{ème} minute d'incubation, avec une perte de 2,5 % par rapport à la valeur d'anisotropie initiale. Ce niveau de fluidité reste stable au cours de l'incubation.

En l'absence d'éthanol, les membranes cellulaires de la souche mutante *Δerg6* se fluidifient après insertion de la sonde. Le niveau de fluidité se maintient ensuite pendant l'incubation des cellules. Suite au choc éthanol, la fluidification est significativement plus élevée que chez la souche sauvage, avec une variation de l'ordre de 4% par rapport à la valeur d'anisotropie initiale. Ce niveau de fluidité reste ensuite stable au cours de l'incubation.

2.1.2. Discussion

L'ensemble des résultats obtenus par l'étude de l'effet d'un choc éthanol direct ou indirect à 20% permet d'émettre l'hypothèse que la nature des stérols membranaires semble influencer sur l'effet négatif de l'éthanol. En effet, la souche sauvage présente une proportion de cellules intègres plus importante que la souche *Δerg6*. Cependant, nous devons souligner que les mesures d'anisotropie réalisées après choc éthanol et lors d'une incubation des cellules en présence de l'éthanol ne nous permettent pas *a priori* de conforter facilement le lien entre résistance à la fluidification induite par l'éthanol et la nature des stérols présents dans la membrane. L'amplitude de fluidification induite par l'ajout de 20% d'éthanol est identique chez les deux souches. Le rétablissement des valeurs d'anisotropie initiales en présence d'éthanol observé dès 15 minutes sur les membranes de la souche mutante reste cependant à expliquer, d'autant plus qu'il a été démontré auparavant qu'un tel choc (20 %) entraînait après 30 minutes de traitement une altération (perméabilisation) plus importante de la membrane chez la souche mutante. On pourrait peut-être préciser que la mesure d'anisotropie est une mesure globale. Une grande proportion de cellules perméabilisées dont la membrane est vraisemblablement déstructurée peut conduire à des valeurs d'anisotropie aberrantes. L'application du choc éthanol sous forme de « pulse » entraîne également une fluidification de la membrane plasmique qui semble être plus importante sur la souche mutante. En absence d'éthanol au cours de l'incubation, les niveaux de fluidité « acquis » suite au choc restent stables chez les deux souches étudiées.

L'éthanol induirait un effet indirect sur la membrane plasmique. Après un contact de 15 minutes avec une concentration forte en éthanol, on observe une évolution de la perméabilisation membranaire ou de la viabilité des levures au cours du temps, même après retrait de l'éthanol. Cet effet n'est visible que sur la souche mutante *Δerg6*, alors que pour la souche WT, le taux de cellules perméabilisées reste constant (environ 30%) et deux fois plus faible que lors d'une incubation en présence d'éthanol (Fig. 31B). Même après retrait de l'éthanol du milieu, la prolongation de l'incubation n'altère pas de façon significative la souche WT (Fig. 36B et 37). Il semble ainsi que la nature des stérols influe sur la perméabilisation de la membrane induite par l'éthanol au cours du temps. La cause de la perte d'intégrité de la membrane au cours du temps pourrait être l'initiation d'une oxydation lors du contact avec l'éthanol qui continuerait de se propager même après retrait de celui-ci. Il a en effet été rapporté que l'éthanol pouvait conduire à des phénomènes oxydatifs pouvant être impliqués dans la mort de cellules biologiques. L'ergostérol, de par sa capacité de protection des lipides contre l'oxydation (Dupont *et al.*, 2012), pourrait être à l'origine du maintien de l'intégrité de la membrane au cours du temps après un choc éthanol.

Ces résultats supportent l'hypothèse du rôle « vecteur » de l'éthanol, dont l'efficacité serait dépendante de la nature des stérols présents au niveau membranaire.

2.2. Expression de gènes-cibles chez les souches WT et *Δerg6* au cours du choc éthanol appliqué sous forme de « pulse » 20% v/v- 15 minutes

Alors qu'une concentration élevée en éthanol représente une perturbation primaire pour la cellule, traduite par une perte d'intégrité membranaire, nous avons émis l'hypothèse que l'une des principales conséquences secondaires du choc éthanol pourrait impliquer dans nos conditions expérimentales la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). La quantification par analyse transcriptomique des principaux gènes marqueurs du choc oxydatif a été réalisée sur les deux souches (WT et *Δerg6*) soumises à un choc éthanol. Nous avons ciblé les gènes *AHP1*, *CTT1*, *SOD1* et *SOD2* codant respectivement pour l'alkyl hydroperoxyde reductase, la catalase T et les superoxydes dismutases dont les ARNm ont été quantifiés par RT-PCR quantitative. Ces différents gènes et leur fonction dans les systèmes de défense contre le stress oxydatif sont présentés dans la Figure 40. Les gènes *PGK1* (3-phosphoglycerate kinase) et *TDH2* (glycéraldéhyde 3P déshydrogénase) ont été choisis comme gènes de référence. Ce sont des gènes codant pour des enzymes constitutives

indispensables pour la cellule. Ces gènes sont dans tous les cas exprimés par la cellule, quelles que soient les conditions environnementales dans lesquelles elle se trouve (Teste *et al.*, 2009, Vaudano *et al.*, 2011). L'expression des gènes est mesurée dans les conditions d'application du choc à 20% sous forme de « pulse » par rapport aux conditions contrôles où les deux souches ne subissent aucun choc.

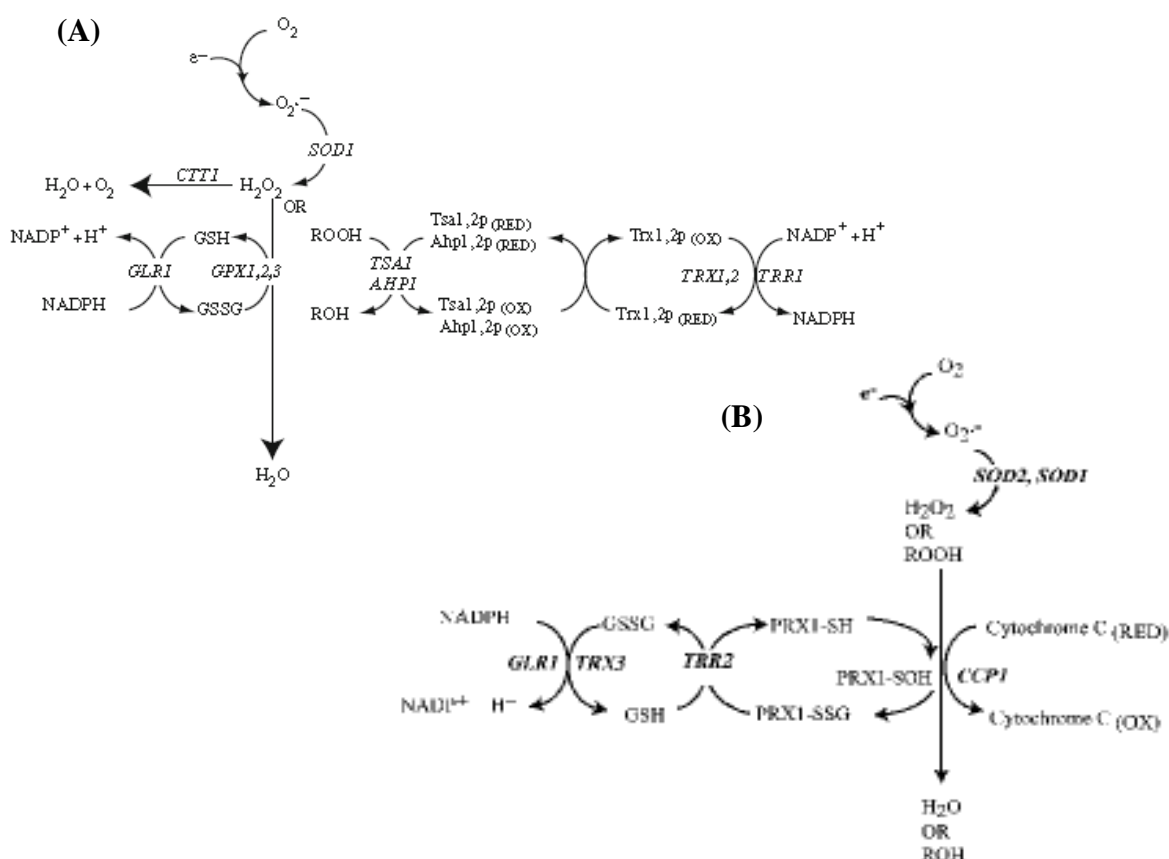


Figure 40 : (A) Espèces réactives de l'oxygène (ROS) et systèmes de défense dans le cytosol. Les principales ROS comprennent le radical anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$, le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et les peroxydes organiques (ROOH) qui sont détoxifiés en H_2O par la Cu, Zn-superoxyde dismutase (codée par *SOD1*), la catalase (codée par *CTT1*) ou les systèmes glutathion (codés par *GLR1* et *GPXI,2,3*). Le peroxyde d'hydrogène et les peroxydes organiques (ROOH) peuvent également être détoxifiés en alcool (ROH) par le système de la thiorédoxine (gènes *TSAI*, *AHP1*, *TRX1,2* et *TRR1*). **(B) Espèces réactives de l'oxygène et systèmes de défense dans les mitochondries.** Les principales ROS sont détoxifiées en H_2O ou en alcools par la Mn-superoxyde dismutase (codée par *SOD2*) ou le système peroxiredoxine-thiorédoxine-glutathion couplé à la cytochrome-c peroxidase (gènes impliqués : *GLR1*, *TRX3*, *TRR2* et *CCPI*) (Aung-Htut *et al.*, 2012).

Suite au choc éthanol à 20% pendant 15 min et élimination de l'éthanol par lavage, de la même façon que précédemment, les échantillons ont été prélevés à différents temps

d'incubation (0, 15, 30 et 60 min). Chaque échantillon a été centrifugé à 1000 rpm pendant 5 min à 4°C. Le culot cellulaire a été recueilli pour l'extraction de l'ARN, la transcription inverse (synthèse de l'ADNc) et la PCR quantitative en temps réel. Le protocole utilisé est schématisé dans la Figure 41 et les résultats obtenus sont présentés Figure 42.

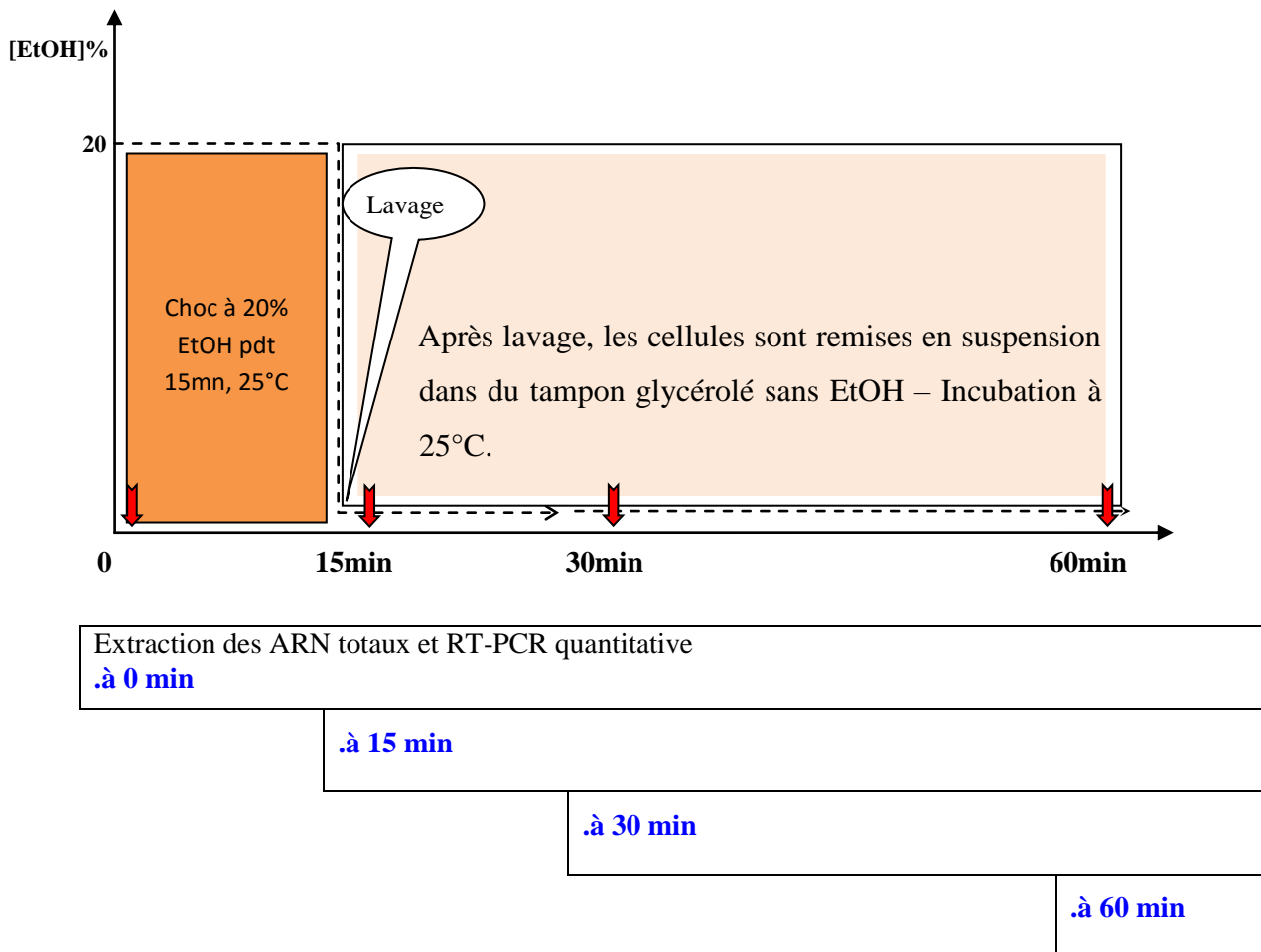


Figure 41 : Schéma du protocole utilisé afin d'étudier l'expression de gènes chez les souches WTet *Aerg6* par RT-qPCR au cours du choc éthanol à 20% v/v pendant 15 min («pulse»).

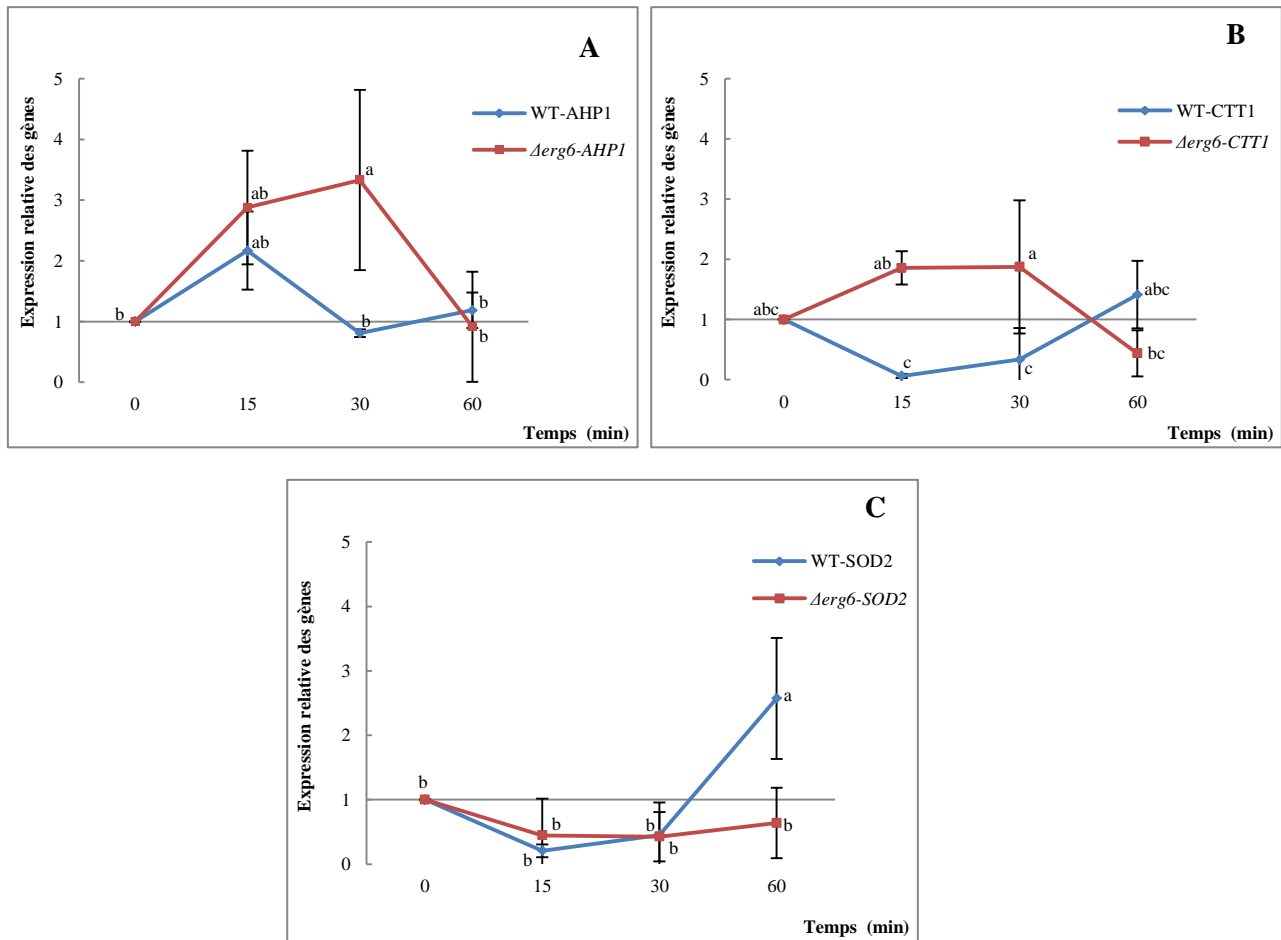


Figure 42 : Niveau d'expression des gènes *AHP1* (A), *CTT1* (B), et *SOD2* (C) chez les souches WT et $\Delta erg6$ par RT-qPCR au cours du choc éthanol à 20% v/v pendant 15 min. Les données sont représentatives de trois essais indépendants. Les niveaux d'expression des gènes sont calculés par rapport aux niveaux d'expression obtenus aux mêmes temps de prélèvement, en absence de choc éthanol. Les valeurs sont une moyenne de trois répétitions biologiques. Le test de significativité est réalisé par une ANOVA ($P \leq 0,05$) à un facteur. Les valeurs dotées de mêmes lettres ne sont pas significativement différentes suivant le test Student *t*.

L'application du choc éthanol entraîne une augmentation du taux de transcrits du gène *AHP1*, dès la 15^{ème} minute chez les deux souches. L'augmentation de transcription de ce gène suite à un choc éthanol a déjà été mise en évidence dans les travaux d'Alexandre *et al.* (2001). Pour la souche sauvage, le taux de transcrits revient au niveau du contrôle (cellules non stressées) dès la 30^{ème} minute d'incubation, alors que le gène reste surexprimé jusqu'à la 30^{ème} minute d'incubation chez la souche mutante $\Delta erg6$. Le gène *AHP1* code pour l'enzyme

cytoplasmique Thioredoxine peroxidase (Jeong *et al.*, 1999). Cette enzyme réduit les formes organiques peroxydes (ROOH) en formes hydroxylées (ROH). L'hypothèse de la formation accrue de formes organiques peroxydes, suite au choc éthanol chez la souche mutante *Δerg6*, pourrait expliquer le maintien du fort taux de transcription du gène *AHP1* observé.

Le gène *CTT1* code pour la catalase T cytoplasmique, impliquée dans la dégradation du peroxyde d'hydrogène en O₂ et H₂O. Il n'y a pas de surexpression de ce gène chez la souche sauvage suite au choc éthanol. Ce résultat est en contradiction avec les données d'Alexandre *et al.* (2001). Ceci pourrait s'expliquer par un temps plus court d'application du choc éthanol (15 minutes dans notre cas, contre 30 minutes dans les travaux cités) qui n'engendrerait pas chez la souche sauvage une augmentation du taux de transcription de ce gène. Par contre, il est observé une surexpression du gène chez la souche mutante à 15 et 30 minutes, démontrant que même dans nos conditions expérimentales, une réponse au choc oxydatif est induite chez cette souche. La formation de peroxyde d'hydrogène provient d'une première étape de détoxification du radical superoxyde O₂⁻, sous l'action des superoxydes dismutases. Les niveaux de transcription du gène *SOD1* codant pour la superoxyde dismutase cytoplasmique ne varient pas suite au choc éthanol chez les deux souches (résultats non montrés). Par contre, il est observé une surexpression, après 60 minutes de traitement, du gène *SOD2* uniquement chez la souche sauvage. Ce gène code pour la superoxyde dismutase Mg-dépendante mitochondriale.

Il existe actuellement très peu de données basées sur les cinétiques de variations de transcriptions de gènes induites par un choc, ce qui rend l'analyse de ces premières données complexe. Toutefois, ces premiers résultats confortent l'hypothèse d'un choc oxydatif induit par l'éthanol, même si ce choc est limité à 15 minutes. La différence de réponse observée pour les gènes *AHP1* et *CTT1* suggère la formation plus importante de formes ROS, induite par le choc éthanol chez le mutant *Δerg6*, supposant une activité et une durée de transcription plus élevées chez cette souche de deux gènes-clés impliqués dans la réponse au choc oxydatif.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

De nombreux travaux ont été réalisés pour mettre en évidence et expliquer les phénomènes de tolérance ou d'intolérance à l'éthanol chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Plusieurs approches expérimentales sont mises en œuvre. Soit la levure est considérée comme productrice d'éthanol (métabolisme fermentaire) (Devantier *et al.*, 2005 ; Henderson *et al.*, 2013) ou, le plus souvent, pour l'étude de l'effet de stress éthanol, elle est cultivée en conditions aérobies, sur milieu standard de laboratoire, puis soumise à des chocs éthanoliques (Alexandre *et al.*, 2001 ; Fujita *et al.*, 2006 ; Abe *et al.*, 2009 ; Teixeira *et al.*, 2009 ; Lam *et al.*, 2014). La levure *Saccharomyces cerevisiae* peut être considérée comme cellule eucaryote modèle, particulièrement étudiée pour comprendre les phénomènes de vieillissement cellulaires engendrés par des stress (Breitenbach *et al.*, 2012). En ce qui concerne plus particulièrement le stress éthanol, ses effets fluidifiant et perméabilisant sur les membranes biologiques ont été largement démontrés dans la littérature (Abe *et al.*, 2009 ; Le Marois, 2013). Cependant, à ce jour, l'effet d'une concentration élevée en éthanol en liaison avec la nature des stérols membranaires reste relativement mal connu. L'objectif principal de ce travail de thèse était d'approfondir la compréhension des mécanismes impliqués dans la résistance de la levure *S. cerevisiae* suite à un choc de forte concentration en éthanol. Une attention particulière a également été portée sur l'influence des stérols membranaires sur la résistance des levures lors de tels chocs, justifiant l'utilisation de souches mutées dans la voie de biosynthèse de l'ergostérol. L'accès à une banque de souches mutantes, affectées dans les dernières étapes de la biosynthèse de l'ergostérol, obtenues à partir de la souche mère de référence *Saccharomyces cerevisiae* BY4742 nous a conduit dans un premier temps à étudier le comportement de l'ensemble des souches analysées cultivées dans des conditions fermentaires (conditions œnologiques). Cependant, la faible activité fermentaire de la souche-mère (Wild type) de laboratoire ne nous a pas permis de discriminer dans de telles conditions les différentes souches mutantes analysées. La réussite d'une telle stratégie serait conditionnée par la réalisation au laboratoire de notre propre banque de mutants, à partir d'une souche levurienne d'intérêt technologique. Cette stratégie originale n'a pas été développée dans le cadre de ce travail mais peut être retenue dans le cadre d'une étude spécifique sur le rôle des stérols chez la levure *S. cerevisiae* en conditions strictement œnologiques.

Nous avons alors opté pour une stratégie plus « classique », consistant à cultiver les souches

sur milieu de laboratoire, Malt Wickerham glycérolé (homéostasie de la pression osmotique du milieu) en présence de concentrations croissantes d'éthanol. Dans ces nouvelles conditions de culture, l'apport d'oxygène est indispensable afin de s'assurer des conditions optimales de synthèse de l'ergostérol chez la souche Wild type, témoin de nos expérimentations. En effet, les enzymes impliquées dans les voies de biosynthèse non seulement des stérols membranaires, mais également des acides gras saturés et insaturés nécessitent la présence d'oxygène dans le milieu (Dupont *et al.*, 2011 ; 2012 ; Jacquier & Schneider, 2012). Il serait intéressant dans la poursuite de nos travaux de conforter nos données par l'analyse complète des lipides membranaires (quantification des différents stérols présents chez toutes les souches analysées, ainsi que la quantification des acides gras saturés et insaturés).

Une discrimination basée sur les calculs des taux de croissance et les populations maximales obtenues a pu être observée pour une concentration initiale de 8% d'éthanol. Une seule souche mutante a été retenue pour la suite de l'étude, il s'agit du mutant *Δerg6* pour étudier de façon plus approfondie les événements membranaires conduisant à la survie ou à la mort des levures lors de perturbations éthanoliques. Le fait de se focaliser sur les mécanismes impliqués dans la mort cellulaire nous a conduits à écarter de notre étude la souche mutante *Δerg4*, caractérisée par une meilleure adaptation par rapport à la souche Wild type aux conditions de croissance appliquées. Ce mutant affecté sur la dernière enzyme impliquée dans la voie de biosynthèse de l'ergostérol accumule l'ergosta-5,7,22, 24 (28)-tétraénol. Ce composé présente une insaturation supplémentaire (position 24-25) par rapport à l'ergostérol. Très récemment, Cheng et Kao (2014) ont mis en évidence une meilleure activité de biocatalyse chez certains mutants de *S. cerevisiae* affectés dans la voie de biosynthèse de l'ergostérol. Plus particulièrement, le mutant *Δerg3*, qui accumule l'épistérol, présente une plus forte thermo-tolérance par rapport à la souche Wild type. La présence d'épistérol induirait une diminution de la rigidité membranaire. Ceci est particulièrement intéressant dans l'optique de l'optimisation de la mise en œuvre de *S. cerevisiae* pour la production d'éthanol en tant que bio-carburant. En effet, une technologie appliquée à des températures supérieures à 40°C (températures létales pour la levure Wild type) permettrait d'augmenter l'efficacité de bio-conversion, tout en diminuant les coûts. L'utilisation de mutants thermo-tolérants pourrait s'avérer être une solution (Caspeta *et al.*, 2014). De la même manière, la tolérance à l'éthanol est particulièrement plus élevée chez une souche mutante accumulant le fécostérol. Les travaux de Lam *et al.* (2014) indiquent une modification des gradients ioniques membranaires (gradients de potassium et gradients protoniques) en corrélation avec l'alcool-tolérance chez

la souche mutante. Forts de ces nouvelles données, il apparaît primordial pour la poursuite de nos travaux d'étudier de façon plus approfondie le mutant *Δerg4*, qui présente dans nos conditions expérimentales une meilleure tolérance à l'éthanol que la souche de référence.

L'effet d'un choc éthanol sur la membrane a été analysé sur les deux souches retenues (Wild type et mutant *Δerg6*) par la détermination de l'évolution des pourcentages de cellules perméabilisées (marquées par l'IP), en corrélation avec l'évaluation de la viabilité, par la méthode UFC. Il existe une corrélation, pour les concentrations en éthanol testées (10, 14, 16, 18, 20, 30 et 40% v/v), entre le pourcentage de cellules perméabilisées et le pourcentage de mortalité cellulaire, suggérant que l'éthanol induit de façon indirecte une mortalité cellulaire. La souche Wild type présente une proportion de cellules intègres plus importante que la souche *Δerg6* après un choc à 20% sur une durée totale de 60 minutes. Dans ces conditions, nous avons constaté que la nature des stérols membranaires, lipides majeurs de la membrane, influence la réponse de la membrane plasmique et la survie cellulaire, et l'ergostérol, de par son potentiel rôle antioxydant, pourrait être primordial dans la résistance des levures au cours du temps de choc éthanol. En effet, l'étude de la résistance au choc éthanol du mutant *Δerg6*, accumulant majoritairement le zymostérol, a montré que ce mutant est plus sensible que la souche sauvage. Pour cela, nous pouvons expliquer, grâce à l'étude de Dupont *et al.* (2011), que l'hypersensibilité de la souche *Δerg6* est due à la modification des propriétés de la membrane plasmique causée par le changement de la nature des stérols de la membrane cellulaire. Cependant, cette hypersensibilité n'est plus observable suite à des chocs supérieurs à 30% d'éthanol.

Afin de mieux appréhender l'effet direct et indirect de l'éthanol sur la membrane plasmique, nous avons élaboré une stratégie, consistant à appliquer de façon limitée dans le temps le stress éthanolique. Une seule concentration en éthanol a été retenue : 20% d'éthanol. L'ensemble des résultats obtenus font l'objet de la deuxième partie de ce travail.

Le premier résultat marquant de cette série d'expériences est que l'exposition aiguë et limitée dans le temps à l'éthanol initie des dégâts membranaires et cellulaires qui perdurent et continuent de s'accroître après le stress. Ces observations démontrent l'existence de processus de dégradation secondaires ou indirects causés par l'éthanol.

Lors de l'application du stress éthanol sous cette forme, il n'existe pas de corrélation directe entre la cinétique d'altération de la membrane observée au cours du temps suite au choc éthanol et les cinétiques de mortalité des deux souches. Ces résultats supportent l'hypothèse

du rôle « vecteur » de l'éthanol, dont l'efficacité serait dépendante de la nature des stérols présents au niveau membranaire. On pourrait peut-être préciser que la mesure de perméabilité permet de mesurer l'altération membranaire à un temps précis alors que la mesure de viabilité intègre un temps plus long. Cela pourrait expliquer l'absence de corrélation.

Les premiers résultats d'analyse de la cinétique de transcription de gènes impliqués dans la réponse au choc oxydatif suggèrent une formation plus importante de formes réactives de l'oxygène, induite par le choc éthanol chez le mutant *Δerg6*. Ceci laisse supposer un rôle fonctionnel prépondérant de l'ergostérol vis à vis d'un choc oxydatif, plus qu'un rôle structural vis à vis d'un agent perméabilisant, tel que l'éthanol. En effet, les mesures d'anisotropie de fluorescence démontrent l'effet fluidifiant instantané de l'éthanol, largement décrit dans la littérature (Sharma, 2006 ; Abe *et al.*, 2009 ; Le Marois *et al.*, 2013). Cependant, l'effet fluidifiant ne semble pas dépendre de la nature des stérols membranaires. L'application du stress éthanol sous forme de « pulse » permet cependant de visualiser des niveaux de fluidité « acquis » différents chez les deux souches, restant stables au cours de l'incubation, malgré le retrait de l'éthanol.

Aucune donnée ne lie actuellement le stress éthanol et le stress oxydatif. L'hypothèse du rôle structural du stérol en tant que vecteur des formes réactives de l'oxygène, en corrélation avec l'éthanol, doit être conforté. Une approche analytique visant à quantifier les formes ROS chez les deux souches soumises à un « pulse 20% ethanol » doit être envisagée dans la poursuite de ce travail. Il serait également envisageable de mettre en place une stratégie plus complexe en combinant stress éthanol, sous forme de « pulse » et maîtrise des conditions redox de l'environnement (anoxie, présence d'agents pro-oxydants, présence d'agents réducteurs).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abe F. & Hiraki T. (2009). Mechanistic role of ergosterol in membrane rigidity and cycloheximide resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1788, 743–752.
- Abe H., Yasuko F., Yuki T., Eri K., Shuntaro Y., Naotaka T. & Ken-ichi N. (2009). Ethanol-tolerant *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated under selective conditions by over-expression of a proofreading-deficient DNA polymerase δ . *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 108(3), 199–204.
- Aguedo M., Beney L., Wache Y., Belin J. & Gervais P. (2002). Interaction of odorous lactones with phospholipids: implications in toxicity towards producing yeast cells. *Biotechnology Letters*, 24, 1975–1979.
- Aguilera F., Peinado R., Millán C., Ortega J. M. & Mauricio J. C. (2006). Relationship between ethanol tolerance, H⁺ -ATPase activity and the lipid composition of the plasma membrane in different wine yeast strains. *International Journal of Food Microbiology*, 110(1), 34–42.
- Akashi K., Miyata H., Itoh H. & Kinoshita K. (1996). Preparation of giant liposomes in physiological conditions and their characterization under an optical microscope. *Biophysical Journal*, 71(6), 3242–3250.
- Alberts B., Bray D., Hopkin K., Johnson A., Lewis J., Raff M. C. & Walter P. (2012). L'essentiel de la biologie cellulaire, (3^e édition), *Medecine Science*, p862.
- Alexandre H., Rousseaux C. & Charpentier C. (1993). Ethanol adaptation mechanisms in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Applied Biochemistry*, 20(2), 173–183.
- Alexandre H., Rousseaux C. & Charpentier C. (1994). Relationship between ethanol tolerance, lipid composition and plasma membrane fluidity in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata*. *FEMS Microbiology Letters*, 124(1), 17–22.

- Alexandre H., Mathieu B. & Charpentier C. (1996). Alteration in membrane fluidity and lipid composition, and modulation of H⁺-ATPase activity in *Saccharomyces cerevisiae* caused by decanoic acid. *Microbiology*, 42, 469–475.
- Alexandre H., Ansanay-Galeote V., Dequin S. & Blondin B. (2001). Global gene expression during short-term ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, 498(1), 98–103.
- Aries V. & Kirsop B.H. (1977). Sterol biosynthesis in relation to growth and fermentation by brewing yeasts inoculated at different concentrations. *Journal of the Institute of Brewing*, 83, 220-223.
- Aries V. & Kirsop B.H. (1978). Sterol biosynthesis by strains of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence and absence of dissolved oxygen. *Journal of the Institute of Brewing*, 84(2), 118–122.
- Arora A., Raghuraman H. & Chattopadhyay A. (2004). Influence of cholesterol and ergosterol on membrane dynamics: a fluorescence approach. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 318(4), 920–926.
- Attfield P. V. (1997). Stress tolerance: the key to effective strains of industrial baker's yeast. *Nature Biotechnology*, 15(13), 1351–1357.
- Aung-Htut M.T., Ayer A., Breitenbach M. & Dawes I.W. (2012). Oxidative stresses and ageing. in *Aging research in yeast - Subcellular Biochemistry - Breitenbach et al. Editors*, 13-54.
- Auesukaree C., Damnernsawad A., Kruatrachue M., Pokethitiyook P., Boonchird C. & Kaneko Y. (2009). Genome-wide identification of genes involved in tolerance to various environmental stresses in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Genetics*, 50(3), 301–310.
- Bagatolli L. & Gratton E. (1999). Two-photon fluorescence microscopy observation of shape changes at the phase transition in phospholipid giant unilamellar vesicles. *Biophysical Journal*, 77(4), 2090–2101.
- Bai J. & Pagano R. E. (1997). Measurement of spontaneous transfer and transbilayer movement of bodipy-labeled lipids in lipid vesicles. *Biochemistry*, 36(1), 8840–8848.

- Bauer E. F. & Pretorius L. S. (2000). Yeast stress response and fermentation efficiency: How to survive the making of wine - A review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 21(12), 27–51.
- Baumann N. A., Sullivan D. P., Ohvo-Rekila H., Simonot C., Pottekat A., Klaassen Z. & Menon A. K. (2005). Transport of newly synthesized sterol to the sterol-enriched plasma membrane. *Biochemistry*, 44, 5816–5826.
- Beaven Michael J., Charpentier C. & Rose A. H. (1982). Production and tolerance of ethanol in relation to phospholipid fatty-acyl composition in *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 431. *Journal of General Microbiology*, 128, 1447–1455.
- Beney L. & Gervais P. (2001). Influence of the fluidity of the membrane on the response of microorganisms to environmental stresses. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57(1-2), 34–42.
- Bisson L. F. & Block D. E. (2002). Ethanol tolerance in *Saccharomyces*. *Biodiversity and Biotechnology of Wine Yeasts*, 85–98.
- Borenstain V. & Barenholz Y. (1993). Characterization of liposomes and other lipid assemblies by multiprobe fluorescence polarization. *Chemistry and Physics of Lipids*, 64(1-3), 117–127.
- Bottema C.D.K., Russel J. & Rodriguez L. (1985). Influence of sterol structure on yeast plasma membrane properties. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 813(12), 313–320.
- Bottema C.D.K., Colleen A. & McLean-Bowen P. (1983). Role of sterol structure in the thermotropic behavior of plasma membranes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 734(2), 235–248.
- Breitenbach M., Jazwinski S. M. & Laun, P. (2012). Aging research in yeast- *Subcellular Biochemistry*.
- Carman G. M. & Han G. S. (2011). Regulation of phospholipid synthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Annual Review of Biochemistry*, 80, 859–883.

- Carman G. M. & Henry S. A. (1999). Phospholipid biosynthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and interrelationship with other metabolic processes. *Progress in Lipid Research*, 38, 361–399.
- Carmelo V. & Bogaerts P. (1996). Activity of plasma membrane H⁺-ATPase and expression of *PMA1* and *PMA2* genes in *Saccharomyces cerevisiae* cells grown at optimal and low pH. *Arch Microbiol*, 166, 315–320.
- Cascio M. (2005). Connexins and their environment: effects of lipids composition on ion channels. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1711(2), 142–153.
- Caspeta L., Chen Y., Ghiaci P., Feizi A., Buskov S., Hallström B. M. & Nielsen J. (2014). Altered sterol composition renders yeast thermotolerant. *Science*, 346(6205), 75–78.
- Chandler M., Stanley G. A., Rogers P. & Chambers P. (2004). A genomic approach to defining the ethanol stress response in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Annals of Microbiology*, 54(4), 427–454.
- Chau F., Lefort A. & Fantin B. (2008). Intérêt et applications de la cytométrie de flux en bactériologie médicale. *Antibiotiques*, 10(4), 226–231.
- Cheng C. & Kao K. C. (2014). How to survive being hot and inebriated. *Science*, 346(6205), 35–36.
- Cooper G.M. (1999). La cellule: Une approche moléculaire. *Springer Science (De Boeck)*, p674.
- Costa V., Piper P. & Mager W. (1996). The molecular defences against reactive oxygen species in yeast. *Molecular Microbiology*, 19(4), 651–658.
- Costa V., E. Reis A. & Quintanilha P. M. (1993). Acquisition of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: The key role of the mitochondrial superoxide dismutase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 300(2), 608–614.
- Cronan J. E. & Gelmann E. P. (1975). Physical properties of membrane lipids: biological relevance and regulation. *Bacteriology Reviews*, 39(3), 232–256.
- D'Amore T., Panchal C. J., Russell I. & Stewart G. G. (1990). A study of ethanol tolerance in yeast. *Critical Reviews in Biotechnology*, 9(4), 287–304.

- D'Amore T. & Stewart G. G. (1987). Ethanol tolerance of yeast. *Enzyme and Microbial Technology*, 9(6), 322–330.
- D'Antuono C., Fernández-Tomé M. C., Sterin-Speziale N. & Bernik D. L. (2000). Lipid-protein interactions in rat renal subcellular membranes: a biophysical and biochemical study. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 382(1), 39–47.
- Del Castillo Agudo L. (1992). Lipid content of *Saccharomyces cerevisiae* strains with different degrees of ethanol tolerance. *Appl Microbiol Biotechnol*, 37, 647–651.
- Denich T., Beaudette L., Lee H. & Trevors J. (2003). Effect of selected environmental and physico-chemical factors on bacterial cytoplasmic membranes. *Journal of Microbiological Methods*, 52, 149–182.
- Devantier R., Scheithauer B., Villas-Bôas S. G., Pedersen S. & Olsson L. (2005). Metabolite profiling for analysis of yeast stress response during very high gravity ethanol fermentations. *Biotechnology and Bioengineering*, 90(6), 703–114.
- Desroche N., Beltramo C. & Guzzo J. (2005). Determination of an internal control to apply reverse transcription quantitative PCR to study stress response in the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni*. *Journal of Microbiological Methods*, 60(3), 325–333.
- Dickey A. N., Yim W.-S. & Faller R. (2009). Using ergosterol to mitigate the deleterious effects of ethanol on bilayer structure. *The Journal of Physical Chemistry B.*, 113(8), 2388–2397.
- Dickson R. C., Sumanasekera C. & Lester R. L. (2006). Functions and metabolism of sphingolipids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Progress in Lipid Research*, 45(6), 447–465.
- Dietrich C., Bagatolli L., Volovyk Z. N., Thompson N. L., Levi M., Jacobson K. & Gratton E. (2001). Lipid rafts reconstituted in model membranes. *Biophysical Journal*, 80(3), 1417–1428.
- Ding J., Huang X., Zhang L., Zhao N., Yang D. & Zhang K. (2009). Tolerance and stress response to ethanol in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(2), 253–263.

- Dinh T. N., Nagahisa K., Hirasawa T., Furusawa C. & Shimizu H. (2008). Adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* cells to high ethanol concentration and changes in fatty acid composition of membrane and cell size. *PloS One*, 3(7), 26–23.
- Dufour J.-P. & Goffeau A. (1980). Phospholipid reactivation of the purified plasma membrane ATPase of yeast. *The Journal of Biological Chemistry*, 255(22), 10591–10598.
- Dupont S., Beney L., Ferreira T. & Gervais P. (2011). Nature of sterols affects plasma membrane behavior and yeast survival during dehydration. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1808(6), 1520–1528.
- Dupont S., Lemetais G., Ferreira T., Cayot P., Gervais P. & Beney L. (2012). Ergosterol biosynthesis: a fungal pathway for life on land ? *Evolution*, 66(9), 2961–2968.
- Eisenkolb M., Zenzmaier C., Leitner E. & Schneiter R. (2002). A specific structural requirement for ergosterol in long-chain fatty acid synthesis mutants important for maintaining raft domains in yeast. *Molecular Biology of the Cell*, 13, 4414–4428.
- Feigenson G. W. & Buboltz J. T. (2001). Ternary phase diagram of dipalmitoyl-PC/dilauroyl-PC/cholesterol: nanoscopic domain formation driven by cholesterol. *Biophysical Journal*, 80(6), 2775–2788.
- Fujita K., Matsuyama A., Kobayashi Y. & Iwahashi H. (2006). The genome-wide screening of yeast deletion mutants to identify the genes required for tolerance to ethanol and other alcohols. *FEMS Yeast Research*, 6(5), 744–750.
- Gasch A. P., Spellman P. T., Kao C. M., Carmel-Harel O., Eisen M. B., Storz G. & Brown P. O. (2000). Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Molecular Biology of the Cell*, 11, 4241–4257.
- Gattoni M. (2003). The effect of isoflurane on erythrocyte membranes studied by ATR-FTIR. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1613(1-2), 72–78.
- Gennis R.B. (1989). Biomembranes: Molecular structure and function. *Springer Science + Business Media, LLC*, p533.
- Georgiou G. & Masip L. (2003). Biochemistry: An overoxidation journey with a return ticket. *Science (New York, N.Y.)*, 300, 592–594.

- Gille G., Sigler K. & Hofer M. (1993). Response of catalase activity and membrane fluidity of aerobically grown *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae* to aeration and the presence of substrates. *Journal of General Microbiology*, 139(7), 1627–1634.
- Glover R. E., Smith R. R., Jones M. V., Jackson S. K. & Rowlands C. C. (1999). An EPR investigation of surfactant action on bacterial membranes. *FEMS Microbiology Letters*, 177(1), 57–62.
- Goni M. & Alonso A. (2000). Spectroscopic techniques in the study of membrane solubilization, reconstitution and permeabilization by detergents. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1508, 51–68.
- Halliwell B. (2007). Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*, 35(5), 1147–1150.
- Henderson C. M., Lozada-Contreras M., Jiranek V., Longo L. & Block D. E. (2013). Ethanol production and maximum cell growth are highly correlated with membrane lipid composition during fermentation as determined by lipidomic analysis of 22 *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(1), 91–104.
- Henderson C. M. & Block D. E. (2014). Examining the role of membrane lipid composition in determining the ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(10), 2966–2972.
- Hendrix J. W. (1970). Sterols in growth and reproduction of fungi. *Annual Review of Phytopathology*, 8(1), 111–130.
- Hossack J. A. & Rose A. H. (1976). Fragility of plasma *Saccharomyces cerevisiae* enriched with different sterols. *Journal of Bacteriology*, 127(1), 67–75.
- Hsueh Y.-W., Gilbert K., Trandum C., Zuckermann M. & Thewalt J. (2005). The effect of ergosterol on dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers: a deuterium NMR and calorimetric study. *Biophysical Journal*, 88(3), 1799–1808.

- Huang C. & Li S. (1999). Calorimetric and molecular mechanics studies of the thermotropic phase behavior of membrane phospholipids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*, 1422(3), 273–307.
- Huang C., Wheeldon L. & Thompson T. E. (1964). The properties of lipid bilayer membranes separating two aqueous phases: Formation of a membrane of simple composition. *Journal of Molecular Biology*, 8(1), 148–160.
- Ingram L. O. (1986). Microbial tolerance to alcohols: role of the cell membrane- Review. *Trends in Biotechnology*, 4(2), 40–44.
- Inoue T., Iefuji H., Fujii T., Soga H. & Satoh K. (2000). Cloning and characterization of a gene complementing the mutation of an ethanol-sensitive mutant of Sake yeast. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 64(2), 229–236.
- Izawa S., Takemura R., Ikeda K., Fukuda K., Wakai Y. & Inoue Y. (2005). Characterization of Rat8 localization and mRNA export in *Saccharomyces cerevisiae* during the brewing of Japanese sake. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69(1), 86–91.
- Jacquier N. & Schneiter R. (2012). Mechanisms of sterol uptake and transport in yeast. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 129(1-2), 70–78.
- Jamieson D. J. (1998). Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 14(16), 1511–1527.
- Jeong J. S., Kwon S. J., Kang S. W., Rhee S. G. & Kim K. (1999). Purification and characterization of a second type thioredoxin peroxidase (Type II TPx) from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry*, 38, 776–783.
- Jiménez-Martí E., Zuzuarregui A., Ridaura I., Lozano N. & del Olmo M. (2009). Genetic manipulation of *HSP26* and *YHR087W* stress genes may improve fermentative behaviour in wine yeasts under vinification conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 130(2), 122–130.
- Jones R. P. & Greenfield P. F. (1987). Ethanol and the fluidity of the yeast plasma membrane. *Yeast*, 3(4), 223–232.

- Juroszek J.R., Feuillat M. & Charpentier C. (1987). Effect of ethanol on the glucose-induced movements of protons across the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 431. *Canadian Journal of Microbiology*, 33(2), 93–97.
- Kajiwara S., Aritomi T., Suga K., Ohtaguchi K. & Kobayashi O. (2000). Overexpression of the *OLE1* gene enhances ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53(5), 568–574.
- Klima A. & Foissner I. (2008). FM dyes label sterol-rich plasma membrane domains and are internalized independently of the cytoskeleton in characean internodal cells. *Plant & Cell Physiology*, 49(10), 1508–1521.
- Klis F. M., Mol P., Hellingwerf K. & Brul S. (2002). Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 26(3), 239–256.
- Kubota S, Takeo I., Kume K., Kanai M., Shitamukai A., Mizunuma T., Miyakawa T., Shimoi H., Iefuji H. & Hirata D. (2004). Effect of ethanol on cell growth of budding yeast: genes that are important for cell growth in the presence of ethanol. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 68(4), 968–972.
- Lam F. H., Ghaderi A., Fink G. R. & Stephanopoulos G. (2014). Engineering alcohol tolerance in yeast. *Science*, 346(6205), 71–75.
- Laroche C., Simonin H., Beney L. & Gervais P. (2005). Phase transitions as a function of osmotic pressure in *Saccharomyces cerevisiae* whole cells, membrane extracts and phospholipid mixtures. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1669(1), 8–16.
- Leão C. & Van Uden N. (1982). Effects of ethanol and other alkanols on the glucose transport system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*, 4(11), 721–724.
- Leão C. & Van Uden N. (1983). Effects of ethanol and other alkanols on the ammonium transport system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*, 25(8), 2085–2089.
- Leao C. & Van Uden N. (1984). Effects of ethanol and other alkanols on passive proton influx in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 774, 43–48.

- Le Marois A. (2013). Action de l'éthanol sur la membrane plasmique de *Saccharomyces cerevisiae*. *AgroParisTech*. p38.
- Lipke P. & Ovalle R. (1998). Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges Minireview. *Bacteriology*, 180(15), 3735–3740.
- Livak K. & Schmittgen T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using Real-Time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25(4), 402–408.
- Lloyd D., Morrell, S., Carlsent H. N., Degnt H., James P. E. & Rowlands C. C. (1993). Effects of growth with ethanol on fermentation and membrane fluidity of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 9, 825–833.
- Lodish H., Berk A., Matsudaira P., Chris A., Krieger M., Matthew P. S., Laurence S. & Darnell J. (2005). Molecular Cell Biology (*Lodish 5th Ed*), p. 961.
- Loura L. M., Fedorov A. & Prieto M. (2001). Fluid-fluid membrane microheterogeneity: a fluorescence resonance energy transfer study. *Biophysical Journal*, 80(2), 776–88.
- Loureiro-Dias M. C. & Peinado J. M. (1982). Effects of ethanol and other alkanols on the maltose transport system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters*, 4(11), 721–724.
- Ma M. & Liu L. Z. (2010a). Quantitative transcription dynamic analysis reveals candidate genes and key regulators for ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Microbiology*, 10, 169.
- Ma M. & Liu Z. L. (2010b). Mechanisms of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(3), 829–845.
- Maillet M. (2006). Biologie cellulaire. *Elsevier Masson*, p618.
- Matsuura K. & Takagi H. (2005). Vacuolar functions are involved in stress-protective effect of intracellular proline in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100(5), 538–44.

- McMurchie E.J. & Raison JK. (1979). Membrane lipid fluidity and its effect on the activation energy of membrane-associated enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 554(2), 364–374.
- Meaden P. G., Arneborg N., Guldeldt L. U., Siegumfeldt H. & Jakobsen M. (1999). Endocytosis and vacuolar morphology in *Saccharomyces cerevisiae* are altered in response to ethanol stress or heat shock. *Yeast*, 1222, 1211–1222.
- Mishra P. (1993). Tolerance of fungi to ethanol. In *Stress Tolerance of Fungi*. 10, 189-208.
- Molina M., Gil C., Pla J., Arroyo J. & Nombela C. (2000). Protein localisation approaches for understanding yeast cell wall biogenesis. *Microscopy Research and Technique*, 51, 601–612.
- Moradas-Ferreira P., Costa V., Piper P. & Mager W. (1996). The molecular defences against reactive oxygen species in yeast. *Molecular Microbiology*, 19(4), 651-658.
- Morano K. A., Grant C. M. & Moye-Rowley W. S. (2012). The response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 190(4), 1157–1195.
- Morein S., Andersson A. S., Rilfors L. & Lindblom G. (1996). Wild type *Escherichia coli* cells regulate the membrane lipid composition in a “window” between gel and non-lamellar structures. *Journal of Biological Chemistry*, 271(12), 6801–6809.
- Mouritsen O. G. (2005). Life-as a matter of fat. The emerging science of lipidomics. *Springer, Heidelberg*. p276
- Munn, A. L., Heese-Peck, A., Stevenson B. J., Pichler H. & Riezman H. (1999). Specific sterols required for the internalization step of endocytosis in yeast. *Molecular Biology of the Cell*, 10, 3943–3957.
- Munro S. (2003). Lipid rafts: elusive or illusive? Review. *Cell Press*, 115, 377–388.
- Nicolson G. L. (2014). The fluid-mosaic model of membrane structure: still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1838(6), 1451–1466.
- Ogawa Y., Nitta A., Uchiyama H., Imamura T., Shimoi H. & Ito K. (2000). Tolerance mechanism of the ethanol-tolerant mutant of sake yeast. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 90(3), 313–320.

- Paltauf F., Kohlwein S. D. & Henry S. A. (1992). Regulation and compartmentalization of lipid synthesis in yeast. *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces: Gene expression. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York., chapter 8*, 415–497.
- Parasassi T., Di Stefano M., Loiero M., Ravagnan G. & Gratton E. (1994a). Cholesterol modifies water concentration and dynamics in phospholipid bilayers: a fluorescence study using Laurdan probe. *Biophysical Journal*, 66(3), 763-768.
- Parasassi T., Di Stefano M., Loiero M., Ravagnan G. & Gratton E. (1994b). Influence of cholesterol on phospholipids bilayers phase domains as detected by Laurdan fluorescence. *Biophysical Journal*, 66(1), 120-132.
- Parasassi T., Krasnowska E. K., Bagatolli L. & Gratton E. (1998). Laurdan and prodan as polarity-sensitive fluorescent membrane probes. *Journal of Fluorescence*, 8(4), 365–373.
- Parker A., Miles K., Cheng K. H. & Huang J. (2004). Lateral distribution of cholesterol in dioleoylphosphatidylcholine lipid bilayers: cholesterol-phospholipid interactions at high cholesterol limit. *Biophysical Journal*, 86(3), 1532–1544.
- Parks L. W. & Casey W. M. (1995). Physiological implications of sterol biosynthesis in yeast. *Annual Review of Microbiology*, 49, 95–116.
- Patton J. L. & Lester R. L. (1991). The phosphoinositol sphingolipids of *Saccharomyces cerevisiae* are highly localized in the plasma membrane. *Journal of Bacteriology*, 173(10), 3101–3108.
- Pereira M. , Herdeiro R. , Fernandes P., Eleutherio E. C. & Panek A. (2003). Targets of oxidative stress in yeast Sod mutants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1620(1-3), 245–251.
- Piper P. W. (1995). The heat shock and ethanol stress responses of yeast exhibit extensive similarity and functional overlap. *FEMS Microbiology Letters*, 134(2-3), 121–127.
- Piper P. W., Talreja K., Panaretou B., Moradas-Ferreira B., Byrne K., Praekelt U. M. Meacock P., Recnacq M. & Boucherie H. (1994). Induction of major heat-shock proteins of *Saccharomyces cerevisiae*, including plasma membrane Hsp30, by ethanol levels above a critical threshold. *Microbiology*, 140, 3031–3038.

- Piper P.W., Ortiz-Calderon C., Holyoak C., Coote P. & Cole M. (1997). Hsp30, the integral plasma membrane heat shock protein of *Saccharomyces cerevisiae*, is a stress-inducible regulator of plasma membrane H⁺-ATPase. *Cell Stress & Chaperones*, 2(1), 12–24.
- Pomeroy M. K., & Raison J. K. (1981). Maintenance of membrane fluidity during development of freezing tolerance of winter wheat seedlings. *Plant Physiology*, 68(2), 382–385.
- Pratt P. L., Bryce J. H. & Stewart G. G. (2007). The yeast vacuole during high gravity wort fermentations. *The Institute of Brewing & Distilling*, 113(1), 55–60.
- Rank G. H. & Robertson A. J. (1983). Protein and lipid composition of the yeast plasma membrane. *Molecular Biology - Yeast Genetics: Fundamental and Applied Aspects*, 225–241.
- Rattray J. B. M., Schibeci A. & Kidby D. K. (1975). Lipids of yeasts. *Bacteriology Reviews*, 39(3), 197–231.
- Repáková J., Holopainen J. M., Morrow M. R., McDonald M. C., Capková P. & Vattulainen I. (2005). Influence of DPH on the structure and dynamics of a DPPC bilayer. *Biophysical Journal*, 88(5), 3398–3410.
- Riezman H. (2006). Organization and functions of sphingolipid biosynthesis in yeast. *Biochemical Society Transactions*, 34(3), 367–369.
- Rodriguez R. J., Low C., Parks L. W. & Bottema D. K. (1985). Multiple functions for sterols in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 837, 336–343.
- Rose A. H. (1993). Composition of the envelope layers of *Saccharomyces cerevisiae* in relation to flocculation and ethanol tolerance. *Journal of Applied Bacteriology*, 74, 110–118.
- Rose A. H. & Harrison J. S. (1993). The yeasts: Yeast technology. *Volume 5, Elsevier*, p664.
- Ribereau-Gayon P., Dubourdieu D., Doneche B. & Lonvaud A. (2006) The microbiology of wine and vinifications. *Volume 1, 2nd Edition, John Wiley & Sons*, p497.
- Ruis H. & Schüller C. (1995). Stress signaling in yeast. *Bioessays*, 17(1), 959–965.

- Sajbidor J. (1997). Effect of some environmental factors on the content and composition of microbial membrane lipids. *Critical Reviews in Biotechnology*, 17(2), 87–103.
- Sajbidor J. & Grego J. (1992). Fatty acid alterations in *Saccharomyces cerevisiae* exposed to ethanol stress. *FEMS Microbiology Letters*, 93, 13–16.
- Sales K., Brandt W., Rumbak E. & Lindsey G. (2000). The LEA-like protein HSP12 in *Saccharomyces cerevisiae* has a plasma membrane location and protects membranes against desiccation and ethanol-induced stress. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1463, 267–278.
- Salgueiro S. P. (1988). Ethanol-induced leakage in *Saccharomyces cerevisiae* : Kinetics and relationship to yeast ethanol tolerance and alcohol fermentation productivity. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(4), 903–909.
- Sanchez Y., Taulien J., Borkovich K. A. & Lindquist S. (1992). Hsp 104 is required for tolerance to many forms of stress. *The EMBO Journal*, 1(6), 2357–2364.
- Schneider R., Brügger B., Sandhoff R., Zellnig G., Leber A., Lampl M. & Kohlwein S. D. (1999). Analysis of the lipid molecular species composition of yeast subcellular membranes reveals acyl chain-based sorting/remodeling of distinct molecular species en route to the plasma membrane. *Journal of Cell Biology*, 146(4), 741–754.
- Schüller C., Brewster J.L., Alexander M.R., Gustin M.C. & Ruis H. (1994). The HOG pathway controls osmotic regulation of transcription via the stress response element (STRE) of the *Saccharomyces cerevisiae* CTT1 gene. *The EMBO Journal*, 13(18), 4382–4389.
- Seigneuret M., Zachowski A., Hermann A. & Devaux P. F. (1984). Asymmetric lipid fluidity in human erythrocyte membrane: new spin-label evidence. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 23, 4271–4275.
- Serrano R. (1991). Transport across yeast vacuolar and plasma membranes. *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces*, 1, 523–585.
- Sharma S. C. (2006). Implications of sterol structure for membrane lipid composition, fluidity and phospholipid asymmetry in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, 6(7), 1047–51.

- Shechter E. (2004). Biochimie et biophysique des membranes - aspects structuraux et fonctionnels 2ème édition. *Sciences Sup : Cours Sciences Sup, Dunod*, p 466.
- Shinitzky M. (1984). Membrane fluidity and cellular functions. *In Physiology of Membrane Fluidity. CRC Press*. p1-52
- Shobayashi M. S., Itsueda S. M., Go M. A. & Ujii T. F. (2005). Effects of culture conditions on ergosterol biosynthesis by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 69(12), 2381–2388.
- Shobayashi M., Ukena E., Fujii T. & Iefuji H. (2007). Genome-wide expression profile of sake brewing yeast under shaking and static conditions. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 71(2), 323–335.
- Singer S. J. and Nicolson G. L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175(4023), 720–731.
- Slaninová I., Sergej Š., & Svoboda A. (2000). Cell wall and cytoskeleton reorganization as the response to hyperosmotic shock in *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Microbiology*, 173(4), 245–252.
- Souza C. M. & Pichler H. (2007). Lipid requirements for endocytosis in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1771(3), 442–454.
- Stanley D., Bandara A., Fraser S., Chambers P. J. & Stanley G. (2010a). The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Applied Microbiology*, 109(1), 13–24.
- Stanley D., Chambers P. J., Stanley G., Borneman A. & Fraser S. (2010b). Transcriptional changes associated with ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 88(1), 231–239.
- Stanley D., Fraser S., Chambers P. J., Rogers P. & Stanley G. (2010c). Generation and characterisation of stable ethanol-tolerant mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 37(2), 139–149.
- Swan T. M. & Watson K. (1997). Membrane fatty acid composition and membrane fluidity as parameters of stress tolerance in yeast. *Canadian Journal of Microbiology*, 43(1), 70–77.

- Swan T. M. & Watson K. (1998). Stress tolerance in a yeast sterol auxotroph: role of ergosterol, heat shock proteins and trehalose. *FEMS Microbiology Letters*, 169(1), 191–197.
- Swan T. M. & Watson K. (1999). Stress tolerance in a yeast lipid mutant: membrane lipids influence tolerance to heat and ethanol independently of heat shock proteins and trehalose. *Canadian Journal of Microbiology*, 45(6), 472–479.
- Takahashi T., Shimoi H. & Ito K. (2001). Identification of genes required for growth under ethanol stress using transposon mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Genetics and Genomics*, 265(6), 1112–1119.
- Teste M. A., Duquenne M., François J. M., & Parrou J.L. (2009). Validation of reference genes for quantitative expression analysis by real-time RT-PCR in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Molecular Biology*, 10, 99.
- Teixeira M. C., Raposo L. R., Mira N. P., Lourenço A. B. & Sá-Correia I. (2009). Genome-wide identification of *Saccharomyces cerevisiae* genes required for maximal tolerance to ethanol. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(18), 5761–5772.
- Thomas D. S., Hossack J. A. & Rose A. H. (1978). Plasma-membrane lipid composition and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Microbiology*, 117(78), 239–245.
- Thomas D. S. & Rose A. H. (1979). Inhibitory effect of ethanol on growth and solute accumulation by *Saccharomyces cerevisiae* as affected by plasma-membrane lipid composition. *Archives of Microbiology*, 122(1), 49–55.
- Tierney K. J., Block D. E. & Longo M. L. (2005). Elasticity and phase behavior of DPPC membrane modulated by cholesterol, ergosterol, and ethanol. *Biophysical Journal*, 89(4), 2481–2493.
- Tomczak M. M., Hinch D. K., Crowe J. H., Harding M. M. & Haymet D. J. (2003). The effect of hydrophobic analogues of the type I winter flounder antifreeze protein on lipid bilayers. *FEBS Letters*, 551(1-3), 13–19.

- Tran Q. H., Nguyen T. T., Le V. V. M. and Hoang K. A. (2010). Effect of Tween 80 and ergosterol supplementation on fermentation performance of the immobilized yeast in high gravity brewing. *International Journal of Food Microbiology*, 17, 309–318.
- Trevors J. T. (2003). Fluorescent probes for bacterial cytoplasmic membrane research. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 57(2), 87–103.
- Tse C. & Capeau J. (2003). Quantification des acides nucléiques par PCR quantitative en temps réel. *Annales de Biologie Clinique*, 61, 279–293.
- Van der Rest M. E., Kamminga H., Nakano A., Anraku Y., Poolman B. & Konings W. N. (1995). The plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function and biogenesis. *Microbiological Reviews*, 59(2), 304–232.
- Van Voorst F., Houghton-Larsen J., Jønson L., Kielland-Brandt M. C. & Brandt A. (2006). Genome-wide identification of genes required for growth of *Saccharomyces cerevisiae* under ethanol stress. *Yeast (Chichester, England)*, 23(5), 351–359.
- Vaudano E., Noti O., Costantini A. & Garcia-Moruno E. (2011). Identification of reference genes suitable for normalization of RT-qPCR expression data in *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation. *Biotechnology Letters*, 33(8), 1593–1599.
- Veiga M. P., Arrondo J. L., Goñi F. M. & Alonso A. (1999). Ceramides in phospholipid membranes: effects on bilayer stability and transition to nonlamellar phases. *Biophysical Journal*, 76(1 Pt 1), 342–350.
- Vernier G. (2006). Proteines amphitropiques : diversité conformationnelle et versatilité des interactions protéines-lipides. *Uni. Joseph-Fourier-Grenoble I*, p131.
- Wells G. B. & Lester R. L. (1983). The isolation and characterization of a mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae* that requires a long chain base for growth and for synthesis of phosphosphingolipids. *The Journal of Biological Chemistry*, 258(17), 1020–1023.
- Woolf T. B. & Roux B. (1996). Structure, energetics and dynamics of lipid-protein interactions: A molecular dynamics study of the gramicidin A channel in a DMPC bilayer. *Proteins*, 24(1), 92–114.

- Zinser E., Paltauf F. & Daum G. (1993). Sterol composition of yeast organelle membranes and subcellular distribution of enzymes involved in sterol metabolism. *Journal of Bacteriology*, 175(10), 2853–2858.
- Zinser E., Sperka-Gottlieb C. D. M., Fasch E., Kohlwein S. D., Paltauf F. & Daum G. (1991). Phospholipid synthesis and lipid composition of subcellular membranes in the unicellular eukaryote *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 173(6), 2026–2034.